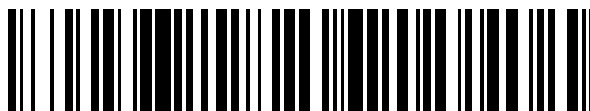


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 592**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2015 PCT/ES2015/070230**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15144964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2015 E 15770042 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3124621**

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

30 Prioridad:

**28.03.2014 ES 201430444**

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

**25.02.2020**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ  
BIOMÈDICA DE BELLVITGE (IDIBELL) (50.0%)  
Hospital Duran i Reynals, 3ª planta, Gran Via de  
l'Hospitalet, 199  
08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES y  
UNIVERSITAT DE BARCELONA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BARRACHINA CASTILLO, MARTA;  
FERRER ABIZANDA, ISIDRE y  
BLANCH LOZANO, MARTA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 744 592 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Marcadores mitocondriales de enfermedades neurodegenerativas

### Campo de la invención

La presente invención se clasifica como parte de los métodos de diagnóstico de enfermedades neurológicas.

#### 5 Antecedentes de la invención

Existe un número considerable de enfermedades neurodegenerativas que están causadas por o están asociadas con alteraciones en la función mitocondrial.

10 La enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) se encuentran dentro de este grupo. Las características fisiopatológicas de la EA y de la EP están relacionadas con depósitos de proteínas agregadas. En concreto, la EA está asociada con la formación de agregados intracelulares de tau fosforilado en los ovillos neurofibrilares y agregados extracelulares del péptido  $\beta$ -amiloide en las placas seniles y la EP está asociada con la formación de agregados anormales de  $\alpha$ -sinucleína que constituyen el componente principal de los llamadas cuerpos de Lewy y neuritas de Lewy.

15 Se acepta que los enfermos de Alzheimer muestran niveles reducidos de la subunidad ND4 en su tejido cerebral y que los pacientes con Parkinson muestran niveles reducidos de ND6 en la sustancia negra. Además, los estudios genéticos han identificado mutaciones en varios genes COX y en la región de bucle D, así como deleciones en el ADNmt en los cerebros de sujetos con EA y en la sustancia negra de sujetos con EP.

20 En la tecnología 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 para enfermedades neurodegenerativas basados en la identificación de mutaciones en el ADN mitocondrial mediante 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. También se ha propuesto un método de diagnóstico de la EP en un sujeto mediante la identificación de polimorfismos de nucleótido único en muestras de ADN mitocondrial de un sujeto (WO 2000063441). Otros documentos de la técnica anterior describen métodos para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer o de Parkinson basados en la identificación de polimorfismos en genes que codifican proteínas nucleares que controlan el proceso de transcripción mitocondrial. A pesar de los esfuerzos hechos hasta la fecha, todavía existe la necesidad de disponer de métodos fiables para diagnosticar enfermedades neurodegenerativas tales como EA y EP, así como para diagnosticar el estadio de dichas enfermedades y para pronosticar la evolución de las mismas.

#### 30 Compendio de la invención

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

- 35 i. los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1
- ii. los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- iii. los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- iv. los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- 40 v. los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,

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

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

50 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar a 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 contiene, en una muestra de dicho sujeto que contiene ADN mitocondrial,

el patrón de metilación en la región de bucle D 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- ii. los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- 5   iii. los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- iv. los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- v. los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

10   en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el 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 elegible para recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer o

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

En un tercer aspecto, la invención se refiere a 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:

- 20   a) determinar en una muestra de dicho sujeto que contiene ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región de bucle D, 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
  - ii. los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
  - 25   iii. los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
  - iv. los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
  - v. los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

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

- 30   en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 con respecto al seleccionado del grupo formado por:
  - i. los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
  - 35   ii. los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
  - iii. los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
  - iv. los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
  - v. los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

40   en donde una hipermetilación al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el 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 elegible para recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer o

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

En un tercer aspecto, la invención se refiere a 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:

- 5 a) determinar en una muestra de dicho sujeto que contiene ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región de bucle D, 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
  - ii. los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
  - iii. los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
  - 10 iv. los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
  - v. los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5
- b) comparar el patrón de metilación determinado en la etapa a) con dicho patrón de metilación obtenido en un estadio anterior de la enfermedad,
- 15 en donde una hipermetilación al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 con respecto a la región de ADN mitocondrial donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:
- a) los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
  - 20 b) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
  - c) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
  - d) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y
  - e) los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5.
- 25 en donde la posición correspondiente a la citosina en el sitio CpG, CHG o CHH es uracilo; y (iii) un polinucleótido que hibrida específicamente con los ácidos nucleicos de (i) o (ii). La presente descripción se refiere además a un kit que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente y de una manera dependiente de metilación con una secuencia de ADN mitocondrial que comprende un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:
- i. los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
  - ii. los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
  - 30 iii. los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
  - iv. los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
  - v. los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5
- La presente descripción se refiere además a un kit que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente en la posición 5' o en la posición 3' con respecto a un sitio de metilación en el ADN mitocondrial seleccionado del grupo formado por:
- (i) los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
  - (ii) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
  - (iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
  - (iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
  - 40 (v) los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5
- en donde la citosina metilada en dicha posición se ha convertido en uracilo o en otra base que es distinguible de citosina en sus propiedades de hibridación.

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

#### Breve descripción de los dibujos

- 5 **Figura 1:** Gráficos Log<sub>2</sub> (OR) para los sitios CpG (A) CHG (B) y CHH (C) en el amplicón del bucle D en la corteza entorrinal de los casos relacionados con patología EA. En el eje de las x se encuentran representados los sitios de metilación 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.
- 10 **Figura 2:** Gráficos Log<sub>2</sub>(OR) para los sitios CpG (A) CHG (B) y CHH (C) en el amplicón de ND1 en la corteza entorrinal de los casos relacionados con patología EA. En el eje de las x se encuentran representados los sitios de metilación de 5' a 3'. Los sitios marcados con un diamante son los sitios diferencialmente metilados de unión de todos los intervalos de confianza del 95%. C: muestras control, AD: Enfermedad de Alzheimer.
- 15 **Figura 3:** Gráficos Log<sub>2</sub> (OR) para sitios CpG y no CpG (CHG y CHH) en el amplicón del bucle D en la sustancia negra de pacientes con EP. En el eje de las x se encuentran representados los sitios de metilación 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.
- 20 **Figura 4:** Gráficos log<sub>2</sub> (OR) para sitios CpG (A) y CHG (B) en el amplicón del bucle D en la corteza frontal de ratones APP/PS1 y ratones salvajes (WT) de tres, seis y doce meses. 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, WT: salvaje, TG: Transgénico.
- 25 **Figura 5:** Gráficos Log<sub>2</sub> (OR) para sitios CG (A), CHG (B) y CHH (C) en el amplicón del bucle D en la corteza frontal de ratones APP/PS1 de tres, seis y doce meses. 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, TG: Transgénico.

#### Descripción detallada de la invención

- 30 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 inventores han encontrado que, sorprendentemente, existen variaciones en el patrón de metilación en la región de bucle D 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 inventores han descubierto patrones de metilación diferenciales asociados con el desarrollo de
- 35 dichas enfermedades.

##### Primer método de la invención

- La primera característica de la invención se refiere a 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 implica determinar en una muestra
- 40 de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en la región de bucle D 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- 45 (iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5;

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

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

El término “diagnóstico” tal y como se usa en este 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 mediante este proceso, es decir, la opinión diagnóstica. Como tal, también se puede considerar como un intento de clasificación 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 técnica, dicho diagnóstico puede no ser correcto para el 100% de los sujetos a diagnosticar, aunque se prefiere que lo sea.

hay variaciones en el patrón de metilación en la región de bucle D y en el gen ND1 en sujetos que padecen EA o EP cuando se compara con sujetos sanos como se demuestra en los ejemplos. Además, los inventores han descubierto patrones de metilación diferenciales asociados con el desarrollo de estas enfermedades.

Primer método de la invención

La primera característica de la invención se refiere a 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 implica determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial, el patrón de metilación en la región de bucle D 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,

(ii) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;

(iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,

(iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o

(v) los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5;

en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativo de que el sujeto padece 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 en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D es indicativo de que el sujeto padece la enfermedad de Parkinson o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Parkinson.

El término “diagnóstico” tal y como se usa en este 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 mediante este proceso, es decir, la opinión diagnóstica. Como tal, también se puede considerar como un intento de clasificación 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 técnica, dicho diagnóstico puede no ser correcto para el 100% de los sujetos a diagnosticar, aunque se prefiere que lo sea.

0,02, 0,01 o menor.

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

El término “enfermedad de Alzheimer” o “demencia senil” o EA se refiere a un deterioro mental asociado con una enfermedad cerebral degenerativa específica que se caracteriza por la aparición de placas seniles, ovillos neuríticos 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 realizaciones preferidas, la enfermedad de Alzheimer está en cualquier estadio de acuerdo con la estadificación de 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 áreas de la región límbica como el hipocampo

- Estadios V-VI: el área cerebral afectada implica también la región neocortical

Esta clasificación por estadios neuropatológicos se correlaciona con la evolución clínica de la enfermedad existente y existe 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 necortical corresponde a una EA completamente desarrollada.

El término “enfermedad de Parkinson” o “parkinsonismo idiopático” o “parálisis agitante” o EP tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una enfermedad crónica y degenerativa que implica problemas de control del movimiento, temblor, rigidez, bradiquinesia en todo tipo de movimientos como el andar, estar sentado, comer hablar, etc., así como inestabilidad postural. Los síntomas de la enfermedad están claramente asociados con 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  $\alpha$ -sinucleína en los denominados cuerpos de Lewy. La “sustancia negra” es un núcleo de los ganglios basales localizada en las porciones superiores del cerebro medio, bajo el tálamo y toma su color de la neuromelanina. En realizaciones preferidas, la EP se encuentra en cualquiera de los estadios de acuerdo con la estadificación de 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 cerúleo y al núcleo del rafé
- 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 de la mesocorteza temporal anteromedial y al allocorteza.
- Estadio V: el área afectada se extiende a la corteza insular, a la corteza cingulada y a la circunvolución temporal.
- Estadio VI: el área afectada se extiende al área frontal y parietal de la corteza cerebral.

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

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

El término “ADN mitocondrial” o “ADNmt” tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al material genético localizado en las mitocondrias de los organismos vivos. Es una molécula bicatenaria, circular, cerrada. En los seres humanos consiste en 16.569 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.

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

En una realización todavía más específica, el fluido biológico se selecciona de sangre periférica o líquido cerebroespinal.

En una realización todavía más específica, 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 es una muestra de tejido cerebral obtenida de la sustancia negra.

Si el material en donde se desea determinar el patrón de metilación según el presente método, es decir ADNmt, se encuentra en un tejido sólido o un fluido biológico 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 35. La extracción del ADN se puede llevar a cabo usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica (Sambrock et al., 2001. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3) que incluyen sin limitación, centrifugaciones en gradientes de densidad, extracción en dos fases usando fenol acuoso o cloroformo con etanol, cromatografía en columna, métodos basados en la capacidad del ADN para unirse a superficies de cristal y/o silicatos, tales como tierra diatomeas como preparaciones o lechos de cristal, empleando kits comerciales, por

ejemplo, los kits "Q-Biogene fast DNA®" o el "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.

5 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 llevarse a cabo usando cualquier método conocido de fraccionamiento celular. Dichos métodos comprenden la ruptura celular previa mediante técnicas que incluyen disrupción física de las membranas, aplicación de ultrasonidos, aplicación de presión o técnicas enzimáticas, seguida de una centrifugación diferencial mediante la aplicación de gradientes de densidad (tales 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 fracción mitocondrial.

15 El primer método de la invención implica determinar el patrón de metilación en una muestra de un sujeto que comprende ADN mitocondrial. El término "metilación del ADN", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un proceso bioquímico que implica la adición de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a los nucleótidos de ADN citosina (C) o adenina (A). La metilación del ADN en la posición 5 de la citosina tiene el efecto específico de represión génica y se ha encontrado en todos los vertebrados examinados. El término "patrón de metilación", tal y como se usa en la presente memoria, 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.

20 Dichos uno o más nucleótidos tienen la capacidad de estar metilados o no. El término "estado de metilación" también se puede utilizar cuando sólo se considera un único nucleótido. Un patrón de metilación se puede cuantificar; en el caso en el que se considera más de una molécula de ácido nucleico.

25 El término "bucle D" o "región control", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una región de ADNmt no codificadora que contiene aproximadamente 1.100 pares de bases, visible bajo microscopía electrónica, que se genera durante la replicación de la cadena H para la síntesis de un corto segmento de la cadena pesada, ADN 7S.

30 El término "ND1" o "NADH deshidrogenasa 1" o "ND1mt", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al gen localizado en el genoma mitocondrial que codifica la proteína NADH deshidrogenasa 1 o ND1. La secuencia del gen ND1 humano se encuentra depositada en la base de datos GenBank (versión del 2 de enero de 2014) bajo el número de acceso NC\_012920. SEQ ID NO: 1. La proteína ND1 forma parte del complejo enzimático denominado complejo I que es activo en las mitocondrias y está implicado en el proceso de fosforilación oxidativa.

35 El término "sitio CpG", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a las regiones de ADN, particularmente regiones de ADN mitocondrial, donde un nucleótido citosina está seguido de un nucleótido guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo de su longitud. "CpG" es una abreviatura de "C-fosfato-G", es decir, citosina y guanina separadas por sólo un fosfato; el fosfato une entre sí dos nucleósidos cualesquiera en el ADN. El término "CpG" se usa para distinguir esta secuencia lineal del apareamiento de bases CG de citosina y guanina. La citosina en los dinucleótidos CpG puede estar metilada para formar 5-metilcitosina.

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

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

45 En una realización específica, 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 en la región de bucle D, seleccionados de los sitios mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de las posiciones CpG 16386 y 256 en la región de bucle D.

Sitio CpG	Posición (pb)
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

5 El término "determinación del patrón de metilación en un sitio CpG", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la determinación del estado de metilación de un sitio CpG particular. La determinación del patrón de metilación de un sitio CpG se puede realizar por múltiples procesos conocidos por el experto en la técnica.

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

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

15 En otra realización específica, 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 mostrados en la Tabla 2.

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

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

En otra realización particular, el primer método de la invención implica determinar el patrón de metilación en un sitio CpG seleccionado del gen ND1 mostrado en la Tabla 2. En otra realización específica, el primer método de la invención implica 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.

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

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

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

Sitio CHG	Posición (pb)
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

El término "determinación del patrón de metilación en un sitio CHG", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la determinación del estado de metilación de un sitio CHG particular.

- 15 La determinación del patrón de metilación de un sitio CHG se puede realizar por múltiples procesos conocidos por el experto en la técnica.

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

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

- 25 En otra realización específica, 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 mostrados en la Tabla 4.

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

Sitio CHG	Posición (pb)
CHG 1	3374
CHG 2	3435
CHG 4	3524

<b>CHG 5</b>	3529
<b>CHG 6</b>	3589
<b>CHG 7</b>	3641
<b>CHG 8</b>	3657

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

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

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

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

<b>Sitio CHH</b>	<b>Posición (pb)</b>
<b>CHH 5</b>	16419
<b>CHH 6</b>	16425
<b>CHH 7</b>	16429
<b>CHH 8</b>	16439
<b>CHH 9</b>	16442
<b>CHH 10</b>	16446
<b>CHH 11</b>	16451
<b>CHH 12</b>	16458
<b>CHH 13</b>	16465
<b>CHH 14</b>	16478
<b>CHH 15</b>	16498
<b>CHH 16</b>	16507
<b>CHH 17</b>	16511
<b>CHH 18</b>	16520
<b>CHH 19</b>	16527
<b>CHH 20</b>	16536
<b>CHH 21</b>	16540
<b>CHH 22</b>	16546
<b>CHH 23</b>	16549
<b>CHH 24</b>	16560
<b>CHH 25</b>	16563
<b>CHH 26</b>	4
<b>CHH 27</b>	11
<b>CHH 28</b>	15
<b>CHH 29</b>	18
<b>CHH 30</b>	26

Sitio CHH	Posición (pb)
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

El término "determinación de un patrón de metilación en un sitio CHH", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la determinación del estado de metilación de un sitio CHH particular. La determinación del patrón de metilación en un sitio CHG se puede realizar por múltiples procesos conocidos por el experto en la técnica.

- 5 En otra realización específica, el primer método de la invención comprende determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHH de la región de bucle D seleccionado de los mostrados en la Tabla 5. En otra realización específica, el primer método de la invención implica 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 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24, al menos 25, al menos 26, al menos 27, al menos 28, al menos 29, al menos 30, al menos 31, al menos 32, al menos 33, al menos 34, al menos 35, al menos 36, al menos 37, al menos 38, al menos 39, al menos 40, al menos 41, al menos 42, o al menos 43 sitios CHH seleccionados de la Tabla 5.

En una realización todavía más específica y preferida de la invención, el primer método de la invención implica determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la tabla 5.

- 15 En métodos preferidos de realización, el primer método de la invención incluye:

(i) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región de bucle D 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 de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG de la región de bucle D mostrados en la Tabla 3

- 20 (iii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG de la región de bucle D 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHH en la región de bucle D 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3

(vi) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4,

(vii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHH de la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

(viii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en la región de bucle D 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3 y/o

(x) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

En algunas realizaciones, la determinación del patrón de metilación en al menos un sitio CpG, al menos un sitio CHG y/o al menos un sitio CHH de acuerdo con el primer método de la invención se lleva a cabo en una muestra de sangre completa, en cuyo caso la determinación se puede realizar directamente. En otras realizaciones, la muestra que contiene ADN mitocondrial, preferiblemente una muestra de ADN total, se extrae de células que están presentes en un fluido biológico (p. ej., sangre completa, fluido cerebroespinal) como una 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 el experto en la técnica (citados supra). Después de aislar y amplificar (si es necesario) el ácido nucleico que contiene ADN mitocondrial, se determina el patrón de metilación de uno o más sitios CpG, uno o más sitios CHG y/o uno o más sitios CHH. El experto en la técnica reconocerá fácilmente que el análisis del patrón de metilación presente en uno o varios de los sitios CpG, CHG y/o CHH descritos en la presente memoria 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.

En otra realización específica, el primer método de la invención implica 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. RRB, Infinium, GoldenGate, Cobra, MSP, MethylLight) y un método por digestión de restricción (p. ej., MRE-seq, o ensayo HELP), pirosecuenciación, o conversión diferencial, restricción diferencial, peso diferencial de los sitios CpG, CHG y/o CHH metilados del ADN.

En una realización específica y preferida de la invención, el patrón de metilación de uno o más sitios CpG, CHG y/o CHH en la región de bucle D 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 (PPi) liberado durante la síntesis del ADN. Dicha técnica emplea una serie de cuatro enzimas para detectar secuencias de ácidos nucleicos durante el proceso de síntesis; ADN polimerasa, ATP sulfilasa, luciferasa y apirasa y emplea como sustratos adenosina 5' fosofosulfato (APS) y luciferina.

Para determinar el patrón de metilación en el ADN mitocondrial, es necesario tratar 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 emparejamiento de bases, mientras las bases de 5-metilcitosina permanecen sin cambios. El término "modificar", tal y como se usa en la presente memoria, significa la conversión de una citosina no metilada en 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 contiene ADN mitocondrial se lleva a cabo con un agente de conversión. El término "agente de conversión" o "reactivo de conversión", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente de la citosina en términos de propiedades de hibridación. El agente de conversión es preferiblemente un bisulfato tal como bisulfitos o sulfito de hidrógeno. Sin embargo, también pueden ser utilizados en el método de la invención otros agentes que modifican de manera similar la citosina no metilada, pero no la citosina metilada, tales como sulfito de hidrógeno. La reacción se realiza de acuerdo con procedimientos estándar (Frommer et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:1827-1831; Olek, 1996, Nucleic Acids Res. 24:5064-6; EP 1394172). También es posible llevar a cabo la conversión enzimáticamente, p. ej. mediante metilación específica de citidina desaminasas.

En una realización preferida del primer método de la invención, la muestra que contiene 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 de la citosina en términos de propiedades de hibridación. En una realización más preferible, 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 contiene ADN mitocondrial ha sido tratada con un bisulfito, la región de bucle D y/o el gen ND1 que contiene uno o más sitios CpG, CHG y/o CHH mostrados en las Tablas 1 a 5 se puede amplificar usando cebadores que permiten distinguir la secuencia no metilada (en el que la citosina del sitio CpG se convierte en uracilo) de la secuencia metilada (en la que la citosina del sitio CpG sigue siendo citosina). Muchos métodos de amplificación se basan en una reacción en cadena enzimática tal como, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), reacción en cadena de la ligasa polimerasa 35, 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 $\beta$ -amplificación, etc, siendo esta lista meramente ilustrativa. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos se describen en Sambrook et al., 2001 (citado 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- (véanse, p. ej., los documentos US 5.137.806, US 5.595.890, US 5.639.611). El uracilo es reconocido como una timina por la Taq polimerasa y, por consiguiente, tras la PCR, el producto resultante contiene citosina sólo en la posición donde existe ADN con 5-metilcitosina en el molde de partida.

En una realización preferida de la invención, una vez que la muestra que comprende ADN mitocondrial, preferiblemente una muestra de ADN total, ha sido tratada con un bisulfito, la región que contiene uno o más sitios 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 que no corresponde a una secuencia nucleotídica que comprende un dinucleótido CpG.

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

En una realización preferida de la invención, tras la amplificación de la región de interés en donde se desea determinar el patrón de metilación (p. ej., en la región de bucle D 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 citosina/timina en cada uno de los sitios puede ser determinada cuantitativamente sobre la base de la cantidad de citosina y timina incorporada durante la etapa de extensión de la secuencia.

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

El término “hipermetilación”, tal y como se usa en la presente memoria, 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 comparado con una muestra de referencia. Dicha muestra de referencia preferiblemente es una muestra que contiene ADN mitocondrial obtenida de un sujeto que no padece una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de EA o EP. En particular, el término se refiere a un número mayor de 5-metilcitosinas en uno o más sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1, en uno o más sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2, en uno o más sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3, en uno o más sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o en uno o más sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5, en una secuencia de ADN mitocondrial cuando se compara con la cantidad relativa de 5-metilcitosinas presente en dichos uno o más sitios en una muestra de referencia.

El término “hipometilación”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a un patrón de metilación alterado en donde uno o más nucleótidos, preferiblemente citosinas en los sitios CpG, CHG y/o CHH, no están metilados comparado con una muestra de referencia. El término “muestra de referencia” se refiere a una muestra que contiene 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 en la región de bucle D 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3, en uno o más sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o en uno o más sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5 en una secuencia de ADN mitocondrial cuando se compara con la cantidad relativa de 5-metilcitosinas presentes en dichos uno o más sitios CpG, uno o más sitios CHG y/o uno o más sitios CHH en una muestra de referencia.

En una realización preferida de la invención, dicha muestra de referencia que contiene ADN mitocondrial se selecciona de muestras de tejido, o fluidos biológicos, preferiblemente muestras de sangre o de fluido cerebroespinal de sujetos. En una realización preferida, dicha muestra de referencia es ADN total. Los métodos para obtener estas muestras, así como los 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 contiene ADN mitocondrial de sujetos con edad concordante.

En este primer método, la invención proporciona algunos sitios CpG, CHG y CHH específicos 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- 5 • una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2, y/o
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4,

10 es indicativa de que el sujeto padece Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer; o

- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3, y/o
- 15 • una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5 es indicativa de que el sujeto padece Parkinson o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Parkinson.

En una realización específica, el primer método de la invención implica determinar el patrón de metilación de todos los sitios CpG, de todos los sitios CHG y de todos los sitios CHH en la región de bucle D 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.

20 Los autores de la presente invención han encontrado que el grado de metilación de los sitios CpG, CHG y CHH en la región de bucle D es mayor en sujetos que padecen Alzheimer en estadios I-II que en sujetos que padecen dicha enfermedad en estadios III-IV.

25 En una realización específica, si el patrón de metilación se observa con respecto al patrón de referencia en una muestra que contiene 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 o una hipometilación en uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3, indica que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer en estadio III-IV.

Segundo método de la invención

30 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para seleccionar a un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson en un sujeto (de aquí en adelante, segundo método de la invención) que implica determinar en una muestra de dicho sujeto que contiene ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región de bucle D 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- 35 ii. los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- iii. los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- iv. los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- v. los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

40 en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el 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

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

- 5 El término “tratamiento preventivo”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a la prevención o conjunto de medidas profilácticas para prevenir una enfermedad para prevenir o retrasar la aparición de los síntomas de la misma, así como para reducir o aliviar los síntomas clínicos de la misma. Particularmente, el término se refiere a la prevención o el conjunto de medidas para prevenir la aparición, para retrasar o para aliviar los síntomas clínicos asociados con una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Los resultados clínicos deseados asociados con la administración de dicho tratamiento a un sujeto incluyen, pero no se limitan a, la estabilización del estadio patológico de la enfermedad, retraso en la progresión de la enfermedad o mejoría en el estado fisiológico del sujeto.
- 10 Los 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 colinesterasa como, por ejemplo, hidrocloruro de donezepil (Arecept), rivastigmina (Exelon) y galantemina (Reminyl) o antagonistas de N-metil D-aspartato (NMDA). Los 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) tales como tolcapona (Tasmar) y entacapona (Comtan), monoamina oxidasa B (MAOB) tales como selegilina (Eldepryl) y rasagalina (Azilect) y agonistas de dopamina tales como pramipexol, rotigotina y ropinirol.
- 15 El término “seleccionar”, tal y como se usa en la presente memoria, 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 de bucle D”, “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 usan con el mismo significado en el segundo método de la invención.
- 25 En una realización específica del segundo método de la invención, la muestra que comprende ADN mitocondrial se selecciona de una biopsia de un tejido sólido o de un fluido biológico. Las muestras pueden ser obtenerse por métodos convencionales conocidos para el experto en la técnica.
- En una realización todavía más específica, el fluido biológico se selecciona de sangre periférica o fluido cerebroespinal.
- En una realización todavía más específica, 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.
- 30 En una realización específica, el segundo método de la invención implica determinar en una muestra de un sujeto que contiene ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CpG en la región de bucle D, mostrados en la Tabla 1.
- 35 En una realización específica, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CpG en la región de bucle D seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 1. En otra realización específica, el primer método de la invención implica 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.
- 40 En una realización todavía más específica y preferida de la invención, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1.
- 45 En otra realización específica, el segundo método de la invención implica 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 en el gen ND1, mostrados en la Tabla 2.
- En otra realización específica, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en un sitio CpG en el gen ND1 seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 2. En otra realización específica, el segundo método de la invención implica 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.
- 50 En una realización todavía más específica y preferida de la invención, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2.
- En otra realización particular, el segundo método de la invención implica determinar en una muestra de un sujeto que contiene ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG en la región de bucle D, mostrados en la Tabla 3.
- En una realización particular, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHG en la región de bucle D seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 3. En otra realización específica, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en al menos 2, al menos 3,

al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13 o al menos 14 o al menos 15 sitios CHG seleccionados de la Tabla 3.

En una realización todavía más específica y preferida de la invención, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3.

- 5 En otra realización específica, el segundo método de la invención implica determinar en una muestra de un sujeto que contiene ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG en el gen ND1, mostrados en la Tabla 4.

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

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

- 15 En otra realización específica, el segundo método de la invención implica determinar en una muestra de un sujeto que contiene ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHH en la región de bucle D, mostrados en la Tabla 5.

- 20 En otra realización específica, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHH en la región de bucle D seleccionado de los mostrados en la Tabla 5. En otra realización específica, el segundo método de la invención implica 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.

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

En métodos preferidos de realización, el segundo método de la invención incluye:

- (i) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2
- 30 (ii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3
- (iii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4
- 35 (iv) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5
- (v) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2 1 y en todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3
- (vi) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4
- 40 (vii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5
- (viii) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3 y en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4
- (ix) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3 y/o
- 45 (x) determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

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

- 50 En una realización específica, el segundo método de la invención implica determinar el patrón de metilación en dichos sitios CpG, CHG y/o CHH mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en método de enriquecimiento

basado en PCR específica de metilación (p. ej. MeDIP, MBD-seq y MethylCap), secuenciación por bisulfito y por un método basado en bisulfito (p. ej. RRB, Infinium, GoldenGate, Cobra, MSP, MethyLight) y un método por digestión de restricción (p. ej., MRE-seq, o ensayo HELP), pirosecuenciación, ensayo de chIP-en-chip, o conversión diferencial, restricción diferencial, peso diferencial de los sitios CpG, CHG y/o CHH metilados del ADN.

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

De acuerdo con el segundo método de la invención:

- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
  - 10 • una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
  - una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5
  - una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2
  - y/o una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, es indicativa de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer; o
  - 15 • una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1
  - una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
  - y/o una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5
- es indicativa de que el sujeto es candidato a recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Parkinson.

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

Tercer método de la invención

- 25 En una tercera característica, la invención se refiere a un método *in vitro* para monitorizar la progresión de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson en un sujeto (de aquí en adelante, tercer método de la invención) que implica:

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

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

- 35 (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 el caso de una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad, es indicativa del avance de la enfermedad de Alzheimer; y en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativa del avance de la enfermedad de Parkinson.
- 40

- 45 El término “monitorizar la progresión”, que es equivalente a “determinar el pronóstico”, se refiere a la determinación de la progresión de una enfermedad en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad. Particularmente, el término se refiere a la determinación de la progresión de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de

Alzheimer y de la enfermedad de Parkinson en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad. Como el experto en la técnica 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.

5 En una realización específica, el sujeto en estudio ha sido diagnosticado con EA en estadio I-II.

En otra realización específica, el sujeto en estudio ha sido diagnosticado con EP en estadios III-V. 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 implica:

10 (a) determinar en una muestra de dicho sujeto que contiene ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región de bucle D, 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,

(ii) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;

(iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,

15 (iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o

(v) los sitios CHH en la región de bucle D 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 el caso de una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad, es indicativa del avance de la enfermedad de Alzheimer; y en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativa del avance de la enfermedad de Parkinson.

El término “monitorizar la progresión”, que es equivalente a “determinar el pronóstico”, se refiere a la determinación de la progresión de una enfermedad en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad. Particularmente, el término se refiere a la determinación de la progresión de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y de la enfermedad de Parkinson en un sujeto diagnosticado con dicha enfermedad. Como el experto en la técnica 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 mediante la determinación de la supervivencia global.

En una realización específica, el sujeto en estudio ha sido diagnosticado con EA en estadio I-II.

35 En otra realización específica, el sujeto en estudio ha sido diagnosticado con EP en

De acuerdo con el tercer método de la invención:

- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,

- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,

- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,

40 • 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 indicativa del avance de la enfermedad de Alzheimer; o

- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,

45 • una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,

- y/o una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,

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

5 La expresión “avance de la enfermedad de Alzheimer”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a que el sujeto se encuentra en un estadio más evolucionado de la enfermedad con respecto al estadio en el que el sujeto 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 los síntomas o manifestaciones clínicas de la enfermedad presentes en dicho sujeto) se considera que el sujeto se encuentra en un estadio más avanzado de la enfermedad si el 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 II I-IV a estar clasificado en un estadio V-VI de la EA.

10 La expresión “avance de la enfermedad de Parkinson”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a que el sujeto se encuentra en un estadio más evolucionado de la enfermedad con respecto al estadio en el que el sujeto 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 los síntomas o manifestaciones clínicas de la enfermedad presentes en dicho sujeto) se considera que el sujeto se encuentra en un estadio más avanzado de la enfermedad si el sujeto pasa a estar clasificado en un estadio III-IV o en un estadio V-VI o si el sujeto pasa de estar clasificado en un estadio III-IV a estar clasificado en un estadio V-VI de la EP.

en uno o más puntos durante el curso del tratamiento.

De acuerdo con el tercer método de la invención:

- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- 20 • una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- una hipermetilación en al menos uno de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- y/o una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativa del avance de la enfermedad de Alzheimer; o
- 25 • una hipometilación en al menos uno de los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- una hipometilación en al menos uno de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- y/o una hipometilación en al menos uno de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,

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

La expresión “avance de la enfermedad de Alzheimer”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a que el sujeto se encuentra en un estadio más evolucionado de la enfermedad con respecto al estadio en el que el sujeto 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 los síntomas o manifestaciones clínicas de la enfermedad presentes en dicho sujeto) se considera que el sujeto se encuentra en un estadio más avanzado de la enfermedad si el 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 II I-IV a estar clasificado en un estadio V-VI de la EA.

40 La expresión “avance de la enfermedad de Parkinson”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a que el sujeto se encuentra en un estadio más evolucionado de la enfermedad con respecto al estadio en el que el sujeto 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 los síntomas o manifestaciones clínicas de la enfermedad presentes en dicho sujeto) se considera que el sujeto se encuentra en un estadio más avanzado de la enfermedad si el 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.

45 En una realización todavía más específica y preferida de la invención, el tercer método de la invención implica determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2.

En una realización específica, el tercer método de la invención implica determinar en una muestra de un sujeto que contiene ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHG en la región de bucle D, mostrados en la Tabla 3.

50 En una realización específica, el tercer método de la invención implica determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHG en la región de bucle D seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 3. En otra realización específica, el tercer método de la invención implica 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 15 sitios CHG seleccionados de la Tabla 3.

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

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

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

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

- 15 En otra realización específica, el tercer método de la invención implica determinar en una muestra de un sujeto que contiene ADN mitocondrial, el patrón de metilación en al menos un sitio seleccionado de los sitios CHH en la región de bucle D, mostrados en la Tabla 5.

- 20 En otra realización específica, el tercer método de la invención implica determinar el patrón de metilación en al menos un sitio CHH en la región de bucle D seleccionado de los sitios mostrados en la Tabla 5. En otra realización específica, el tercer método de la invención implica 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.

- 25 En una realización todavía más específica y preferida de la invención, el tercer método de la invención implica determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5.

En métodos preferidos de realización, el tercer método de la invención incluye:

- i. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2,
- 30 ii. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG de la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- iii. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4,
- 35 iv. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1 y en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,
- v. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2 1 y en todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- vi. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHG en el gen ND1 30 mostrados en la Tabla 4,
- 40 vii. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2 y en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5.
- viii. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3 y en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o
- ix. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3
- 45 x. determinar el patrón de metilación en todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y en todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5.

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

- 50 En otra realización específica, el tercer método de la invención implica determinar el patrón de metilación en dichos sitios CpG, CHG y/o CHH mediante una técnica seleccionada del grupo que consiste en PCR específica de metilación

(MSP), un método basado en enriquecimiento (p. ej. MeDIP, MBD-seq y MethylCap), secuenciación por bisulfito y por un método basado en bisulfito (p. ej. RRBS, Infinium, GoldenGate, Cobra, MSP, MethyLight) y un método por digestión de restricción (p. ej., MRE-seq, o ensayo HELP), pirosecuenciación, o conversión diferencial, restricción diferencial, peso diferencial de los sitios CpG, CHG y/o CHH metilados del ADN.

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

10 En otra realización específica, el tercer método de la invención implica determinar el patrón de metilación de todos los sitios CpG, de todos los sitios CHG y de todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en las Tablas 1, 3 y 5, y el patrón de metilación de todos los sitios CpG y de todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en las Tablas 2 y 4.

Cuarto método de la invención

15 Los autores de la presente invención han descubierto un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la región de bucle D del ADN mitocondrial que está estadísticamente asociado con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer si dicho SNP se encuentra en al menos el 60% de las moléculas de ADNmt de un sujeto.

20 Por lo tanto, en la cuarta característica, la invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto (de aquí en adelante, el cuarto método de la invención) que implica determinar en una muestra que contiene ADN mitocondrial de dicho sujeto el nucleótido en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 (SEQ ID NO: 1) en la base de datos NCBI, en donde la detección del nucleótido C en dicha posición polimórfica o la presencia del nucleótido C en dicha posición polimórfica en al menos el 60% de las moléculas de ADN mitocondrial de dicho sujeto es indicativa de que el sujeto padece dicha enfermedad o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad.

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

30 La presencia de un nucleótido específico en una posición polimórfica puede definirse como el porcentaje de moléculas de ADN que tienen dicho nucleótido en dicha posición polimórfica con respecto al total de moléculas de ADN presentes en la muestra. De acuerdo con el cuarto método de la invención, se considera que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 cuando el porcentaje de moléculas que presentan dicho nucleótido en dicha posición es de al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o más.

35 En una realización específica, se considera que el sujeto tiene la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en el 60% de las moléculas de ADNmt. En una realización preferida de la invención, se considera que el sujeto tiene la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en el 71% de las moléculas de ADNmt.

40 En otra realización preferida de la invención, se considera que el sujeto tiene la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar dicha enfermedad si el ADNmt de dicho sujeto presenta el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en el 74% de las moléculas de ADNmt. En otra realización preferida de la invención, se considera que el sujeto tiene 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.

50 Como el experto en la materia sabe, una muestra que contiene ADN mitocondrial puede ser homoplásmica o heteroplásmica. El término “heteroplasmia” o “ADN mitocondrial heteroplásmico”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al ADN mitocondrial de un sujeto que consiste en una mezcla de ADN de al menos dos genotipos diferentes de mitocondrias. El término “homoplasmia” o “ADN mitocondrial homoplásmico”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al ADN mitocondrial de un sujeto que está formado por una única genotipo de ADN de un único genotipo mitocondrial.

55 En una realización específica, en el contexto de la presente invención, la muestra de ADN mitocondrial es homoplásmica, en cuyo caso todas las mitocondrias presentes en el sujeto contienen material genético idéntico por lo que todas las mitocondrias de un sujeto presentan en su genoma el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920. En aquellas realizaciones en donde la muestra de ADN mitocondrial es homoplásmica, el cuarto método de la invención permite diagnosticar o determinar el riesgo de

desarrollar la enfermedad de Alzheimer en un sujeto mediante la detección del nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en dicha muestra de ADN mitocondrial; es decir, la detección del nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en una muestra de ADN mitocondrial homoplásmica de un sujeto es indicativa de que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad. Por el contrario, la detección del nucleótido T en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en una muestra de ADN mitocondrial homoplásmica, indica que el sujeto no padece la enfermedad de Alzheimer o que el sujeto tiene un riesgo bajo de desarrollar la enfermedad.

En otra realización específica y preferida de la invención, la muestra de ADN mitocondrial es heteroplásmica, es decir el ADNmt del sujeto es de dos poblaciones mitocondriales cuyo material genético no es idéntico entre sí. De acuerdo con esta invención, la heteroplasmia se refiere al hecho de que un porcentaje de dichas 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 que el porcentaje restante de mitocondrias de dicho sujeto presentan en su genoma el oligonucleótido T en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920.

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

La determinación de la 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 técnica. Los ejemplos ilustrativos no limitativos de técnicas que permiten determinar si una muestra de ADN mitocondrial es heteroplásmica incluyen, pero no se limitan a, transferencia southern, o 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 con la creación o destrucción de secuencias específicas o dianas de una o varias enzimas de restricción. La detección de heteroplasmia mediante la técnica PCR-RFLP es una primera etapa en la amplificación de la región del material genético que contiene el polimorfismo que se desea detectar, mediante el empleo de 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 un patrón de restricción específico diana, los tamaños de los fragmentos obtenidos determinan si la muestra está formada por un único patrón de bandas, en cuyo caso la muestra es homoplásmica. Sin embargo, si el análisis determina la presencia de dos patrones de bandas, correspondientes a dos poblaciones diferentes de ADN mitocondrial, entonces la muestra de ADNmt es heteroplásmica.

El término "polimorfismo de nucleótido único" o "polimorfismo de un único nucleótido" o "SNP", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una variación en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico que se produce en un único 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 único nucleótido en el genoma se altera (por ejemplo, por medio de sustitución, adición o delección). Cada versión de la secuencia con respecto al sitio polimórfico se refiere como un alelo del sitio polimórfico. Los SNP tienden a ser estables evolutivamente de generación en generación y, como tales, pueden usarse para estudiar anomalías genéticas específicas en una población.

La variante polimórfica de la invención es la posición 16519 sobre la base de la numeración definida por el número 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 usan indistintamente en la presente memoria, y se refieren a la determinación de una secuencia de un SNP particular en el sujeto objeto de estudio. La determinación de la secuencia de los SNP se puede realizar por medio de varios procesos conocidos por el experto en la técnica.

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

En una realización todavía más específica, el fluido biológico se selecciona de sangre periférica o fluido cerebrospinal.

En una realización todavía más específica, 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 fluido biológico, preferiblemente se procede a una extracción previa del ácido nucleico de la muestra empleando cualquier técnica apropiada para ello.

5 En una realización preferida de la invención, la fracción de ADN adecuada para la implementación de la invención es el ADN total. La extracción del ADN se puede llevar a cabo usando cualquier método conocido por el experto en la técnica tal y como se ha detallado para el primer método de la invención.

10 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 realizarse usando cualquier método conocido de fraccionamiento celular y que han sido detallados en el primer método de la presente invención.

15 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 tales, los sistemas y métodos limitados a, secuenciación de ácidos nucleicos, métodos de hibridación y la tecnología de matriz (p. ej., la tecnología disponible en BioSciences Aclara, Affymetrix, Agilent Technologies, Inc. Illumina, etc); también se pueden utilizar en técnicas basadas en el desplazamiento de la movilidad de los fragmentos de ácido nucleico amplificados, por ejemplo, *Polimorfismo Conformacional de Cadena Única* (SSCP), *electroforesis en gel en gradiente desnaturante* (DGGE), *Escisión Química de Emparejamientos Erróneos* (CMC), *Polimorfismos de Fragmentos de Restricción* (RFLP), PCR-RFLP, *análisis WAVE* 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 técnica pueden usar cualquier método apropiado para lograr dicha detección.

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

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

Quinto método de la invención

30 En una quinta característica, la invención corresponde a un método *in vitro* para seleccionar a un sujeto para someterlo a un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer que implica determinar en una muestra que contiene ADN mitocondrial de dicho sujeto el nucleótido en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en la base de datos NCBI, en donde la detección del nucleótido C en dicha posición polimórfica o la presencia del nucleótido C en dicha posición polimórfica en al menos un 60% de las moléculas de ADN mitocondrial es indicativa 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 los métodos para obtener la muestra y detectar un polimorfismo han sido detallados en el contexto del primer, segundo, tercer y cuarto método de la invención y se usan aquí con el mismo significado.

40 De acuerdo con el quinto método de la invención, se considera que el sujeto es un candidato para ser sometido a un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer si el ADNmt del sujeto tiene el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 cuando el porcentaje de moléculas de ADNmt que tienen 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 específica, se considera que el sujeto es elegible para 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.

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

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

5 En una realización específica, en el contexto de la presente invención, la muestra de ADN mitocondrial es homoplásmica, en cuyo caso todas las mitocondrias presentes en el sujeto contienen material genético idéntico por lo que todas las mitocondrias de un sujeto presentan en su genoma el nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920. En aquellas realizaciones en donde la muestra de ADN mitocondrial es homoplásmica, el quinto método de la invención permite seleccionar a un paciente para someterlo a un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer mediante la detección del nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en dicha muestra de ADN mitocondrial; es decir, la detección del nucleótido C en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en una muestra de ADN mitocondrial homoplásmica de un paciente es indicativa de que el sujeto es elegible para recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer. Por el contrario, la detección del nucleótido T en la posición polimórfica 16519 según la secuencia definida con el número de acceso NC\_012920 en una muestra de ADN mitocondrial homoplásmica de un paciente es indicativa de que dicho paciente no es candidato para recibir un tratamiento preventivo de la enfermedad de Alzheimer.

20 En otra realización específica y preferida de la invención, la muestra de ADN mitocondrial es heteroplásmica, es decir el ADNmt del sujeto es de dos poblaciones mitocondriales cuyo material genético no es idéntico entre sí. De acuerdo con la presente invención, la heteroplasmia se refiere a un porcentaje de las mitocondrias de dicho sujeto que 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. Los métodos para determinar si una muestra es homoplásmica o heteroplásmica así como para determinar el grado de heteroplasmia de una muestra han sido detallados en el contexto del cuarto método de la invención.

25 En una realización todavía más específica, el fluido biológico se selecciona de sangre periférica o fluido cerebroespinal.

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

30 Si el material en donde se desea determinar dicho SNP según el presente método es un tejido sólido o un fluido biológico, 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 implementación de la invención es el ADN total. La extracción del ADN puede llevarse a cabo usando cualquier método apropiado conocido por los expertos en la técnica tal y como se ha detallado para el primer método de la invención.

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

Polinucleótidos de la invención

35 En otra característica, la presente invención corresponde a un ácido nucleico (de aquí en adelante "primer polinucleótido de la invención") que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADNmt en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1.

40 El término "polinucleótido", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas de ADN o ARN 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 específica, el primer 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.

45 En otra característica, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante "segundo polinucleótido de la invención") que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADN mitocondrial en donde dicha región contiene al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2.

50 En una realización específica, el segundo polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CpG seleccionado de la Tabla 2. En otra característica, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante "segundo polinucleótido de la invención") que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3.

- En una realización específica, el tercer polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHG seleccionado de la Tabla 3.
- 5 En otra característica, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “cuarto polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADN mitocondrial en donde dicha región contiene al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4.
- 10 En una realización específica, el cuarto 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 otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “quinto polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADNmt en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5.
- 15 En una realización específica, el quinto polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHH seleccionado de la Tabla 5.
- En otra característica, la presente invención corresponde a un ácido nucleico (de aquí en adelante “sexto polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CpG en la región de bucle D 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 polinucleótidos contiguos en 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 posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CpG es uracilo.
- 30 En una realización particular, el séptimo polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CpG seleccionado de la Tabla 2, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CpG es uracilo.
- 35 En otra característica, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “octavo polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHG es uracilo.
- 40 En una realización particular, el octavo polinucleótido de la invención comprende al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más nucleótidos contiguos a dicho al menos un sitio CHG seleccionado de la Tabla 3, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHG es uracilo.
- 45 En otra característica, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “noveno polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHG del gen ND1 mostrados en la Tabla 4, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHG es uracilo.
- En una realización específica, 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.
- 50 En otra característica, la presente invención se refiere a un ácido nucleico (de aquí en adelante “décimo polinucleótido de la invención”) que comprende al menos 9 polinucleótidos contiguos en una región del ADN mitocondrial en donde dicha región comprende al menos un sitio de metilación seleccionado de los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5, en donde la posición correspondiente a la citosina en dicho sitio CHH es uracilo.

En una realización específica, 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.

- 5 En otra característica, la invención se refiere a un polinucleótido que hibrida de forma específica con dichos primero, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo polinucleótidos de la invención.

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

Como se conoce en la tecnología, la "similitud" entre dos moléculas de ácido nucleico se determina comparando la secuencia de nucleótidos de una molécula con 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 dicho al menos un sitio CpG, CHG y CHH seleccionado de los sitios mostrados en las Tablas 1 a 5. El grado de identidad entre dos moléculas de ácido nucleico se determina utilizando algoritmos informáticos y métodos que son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica. 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, Altschul, S., et al, J. Mol Biol. 215: 403-10).

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación se determina fácilmente por un experto en la técnica, 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 desnaturizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que puede utilizarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas más bajas no tanto. Para detalles adicionales y una explicación de la astringencia de las reacciones de hibridación, véase, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

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

Las "condiciones moderadamente astringentes" pueden identificarse como se describe por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de disolución de lavado y condiciones de hibridación (p. ej., temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante la noche a 37 °C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), disolución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10% y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturizado fragmentado, seguido por lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 35 37-50 °C. El experto en la técnica conocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. en caso necesario para adaptar factores tales como longitud de la sonda y similares.

## 50 Kits

La presente descripción se refiere además a un kit (de aquí en adelante "primer kit de la descripción"), que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar de forma específica y de forma dependiente de metilación con una secuencia de ADN mitocondrial que comprende un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:

- (i) los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,  
 55 (ii) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2,  
 (iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,

(iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o

(v) los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

5 Los términos "sitio CpG", sitio CHG, "sitio CHH", "región de bucle D" 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 usan con el mismo significado en el contexto de los kits de la invención.

En una realización preferida, los oligonucleótidos son parte del kit que es capaz de hibridar de forma específica de forma dependiente de metilación con una secuencia de ADN mitocondrial que comprende un sitio de metilación seleccionado del grupo que consiste en

10 (i) los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,

(ii) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2,

(iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,

(iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o

(v) los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5

15 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 realizaciones 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.

20 Los kits adecuados incluyen diversos reactivos para uso de acuerdo con la presente invención, en contenedores adecuados y materiales de envasado, incluidos tubos, viales, y envases retractilados y moldeados por soplado. Además, los kits 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 leídas 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. Los materiales adecuados para su inclusión en un ejemplar de kit de acuerdo con la presente descripción 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 amplificación de PCR o 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 las diversas regiones amplificadas producidas (p. ej., agarosa o poliacrilamida y un tampón para ser utilizado en electroforesis, columnas de HPLC, geles de SSCP, geles de formamida o un soporte de matriz para MALDI-TOF ).

30 El término "oligonucleótido", tal y como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de ADN o ARN corta, con hasta 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.

35 Tal y como se usa en el kit de la descripción, se usa al menos un oligonucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CpG en la región de bucle D 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 en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2, al menos un oligonucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3, al menos un oligonucleótido capaz de hibridar con al menos una secuencia de un sitio CHG en el 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5, de manera específica de metilación, como un cebador para amplificar la región que contiene dicho o dichos sitios CpG, CHG y/o CHH. Alternativamente, también puede usarse al menos un oligonucleótido como una sonda para detectar dichos sitios CpG, CHG o CHH metilados o no metilados.

50 En una realización preferida del primer kit de la descripción comprende oligonucleótidos capaces de hibridar de forma específica con todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1, con todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2, con todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3, con todos

los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4 y/o con todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5.

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

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

En otra característica, la invención se refiere a un kit (de aquí en adelante "segundo kit de la descripción"), que comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar de forma específica con una zona en la posición 5' a 3' con respecto a un sitio de metilación de ADN mitocondrial seleccionado del grupo que consiste en:

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

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

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

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

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

5 En una realización específica, el segundo kit de la descripción comprende, además, uno o más reactivos para convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente de la citosina en términos de propiedades de hibridación.

10 En una realización preferida, el uno o más reactivos para convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente de la citosina en términos de propiedades de hibridación es un bisulfito, preferiblemente bisulfito de sodio. El reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que es detectable diferencialmente de la citosina en términos de propiedades de hibridación es metabisulfito, preferiblemente metabisulfito de sodio.

El término "reactivo de conversión" 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 específica, el segundo kit de la descripción 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.

En otra característica, la invención se refiere al uso del primer y/o segundo kit de la descripción 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.

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

### Ejemplos

#### Materiales y métodos

#### Diseño del estudio y sujetos incluidos

25 El estudio se llevó a cabo en 44 muestras, incluyendo patología relacionada con la 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 del bucle D y ND1 en muestras de corteza entorrinal de casos de patología relacionada con EA y sus controles correspondientes (Tabla 7). En el carril 2 se analizaron los amplicones del bucle D en muestras de sustancia negra de EP y sus controles correspondientes (Tabla 7). Cada paciente fue identificado en los cebadores utilizados con un MID (*identificador múltiple*) (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 de 40-1098 pares de bases (pb) con una longitud media de aproximadamente 417 pb. En el carril 2 el número de secuencias obtenidas fue de 513.579, cuya longitud variaba desde 40 hasta 933 pb (longitud media de 466 pb). Los alineamientos de las secuencias obtenidas para cada MID, amplicón y carril frente a sus respectivas secuencias de referencia fueron anotados y los porcentajes de identidad entre éstas estaban cerca del 100%. La media y mediana de las tasas de conversión de bisulfito para cada locus y MID fueron analizadas.

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

45 Tabla 6: Número de sitios diferencialmente metilados. FRD: valor p ajustado con el método de Benjamini y Hocheberg (1995)

Carril	Amplicón	Sitio	Criterio	Nº de sitios	C frente a EA I-II	C frente a EA III-IV	EA I-II frente a EA III-IV	C frente a EP
L1	Bucle D	CG	FDR<0,01	18	17	14	12	-
L1	Bucle D	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	-

ES 2 744 592 T3

L1	Bucle D	CHG	FDR<0,01	16	13	10	1	-
L1	Bucle D	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	Bucle D	CHH	FDR<0,01	52	0	0	34	-
L1	Bucle D	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	Bucle D	CG	FDR<0,01	18	-	-	-	17
L2	Bucle D	CG	FDR<0,05	18	-	-	-	17
L2	Bucle D	CHG	FDR<0,01	16	-	-	-	14
L2	Bucle D	CHG	FDR<0,05	16	-	-	-	14
L2	Bucle D	CHH	FDR<0,01	52	-	-	-	44
L2	Bucle D	CHH	FDR<0,05	52	-	-	-	44

Tabla 7: Resumen de las principales características clínicas y casos humanos neuropatológicos analizados

MID	Carril	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	I / A	0	M	57	5
10	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	64	2,15
11	L1	entorrinal	EA asociada	I	0	H	59	16,3
12	L1	entorrinal	EA asociada	II / A	0	M	86	4,15
13	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	H	67	14,4
14	L1	entorrinal	EA asociada	II / A	0	H	66	4,55
15	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	63	8,05
16	L1	entorrinal	EA asociada	II / A	0	M	76	5,45
17	L1	entorrinal	EA asociada	III / A	0	M	71	6,45
18	L1	entorrinal	EA asociada	III/A	0	M	77	11,5
19	L1	entorrinal	EA asociada	III/B	0	H	86	3,1
20	L1	entorrinal	EA asociada	IV/C	0	M	69	8,1
9	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	57	5
10	L1	entorrinal	EA asociada	I / A	0	M	64	2,15
11	L1	entorrinal	EA asociada	I	0	H	59	16,3
12	L1	entorrinal	EA asociada	II / A	0	M	86	4,15
21	L1	entorrinal	EA asociada	III	0	M	79	3,4

MID	Carril	Región cerebral	Diagnóstico	Estadio de Braak para EA	Estadio de Braak para EP	Género	Edad	Tiempo postmortem (h)
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
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	I / 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

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  $\alpha$ -sinucleína (cuerpos de Lewy).

Tabla 8: secuencia MID asociada a cada caso analizado

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	TCACGTAATA	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

## Muestras de cerebro humano

- 5 Las muestras de tejido fueron proporcionadas por el Banco de Tejido Neurológico, Universidad de Barcelona – Hospital de Barcelona y el Banco del Instituto de Neuropatología, HUB-ICO-IDIBELL. La donación y obtención de las muestras estuvo regulada por el comité ético de ambas instituciones. La mitad de cada cerebro fue mantenida en disolución tamponada de formalina al 4% para el estudio morfológico e histológico, mientras que la otra mitad fue procesada en secciones coronales para congelarse a -80C para estar disponibles para estudios bioquímicos. El examen neuropatológico en todos los casos controles y patológicos se llevó a cabo en treinta secciones estandarizadas del
- 10 cerebro, cerebelo y tronco encefálico, que se tiñeron con hematoxilina y eosina, y Klüver Barrera, o se procesaron para inmunohistoquímica para la proteína ácida glial fibrilar, marcadores microgliales, beta-amiloide, tau fosforilada (anticuerpo AT8),  $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -cristalina, ubiquitina y TDP-43. Los casos con patología relacionada con EA y EP fueron clasificados de acuerdo con los criterios neuropatológicos actuales (Braak y Braak 1991, 1999; Braak et al, 2003, 2006). Los casos con patología mixta (incluyendo lesiones vasculares) fueron excluidos de este estudio. Los
- 15 cerebros usados como control pertenecieron a individuos sin manifestaciones neurológicas y sin lesiones en el estudio neuropatológico. Las historias clínicas fueron reexaminadas para cada caso, y los casos con patología relacionada con la EA (estadios I-IV) fueron reevaluados mediante llamadas telefónicas o entrevistas con familiares, preguntando si tenían constancia de algún impedimento neurológico o cognitivo. Sólo los casos que cumplían estos criterios fueron considerados en el presente trabajo. Todos los casos analizados se resumen en la Tabla 7.
- 20 El intervalo promedio post-mortem de las muestras de corteza entorrinal fue de  $4,98 \pm 1,57$  horas en los controles,  $7,51 \pm 5,13$  horas en estadios I-II, y  $5,70 \pm 2,85$  horas en estadios III-IV; para las muestras de la sustancia negra los intervalos fueron  $5,59 \pm 2,46$  horas y  $9,23$  en controles  $\pm 7,07$  horas en el caso de EP.

## Muestras de cerebro de murino

- 25 Los ratones transgénicos APP/PS1 y la cepa natural se obtuvieron de Jackson Laboratory (EE. UU.). El modelo transgénico expresa una molécula APP (Mo/HuAPP695swe: Swedish mutation APP) quimérica de murino/humano y

la variante humana de presenilina 1 (PS1-DE9), ambas expresiones en neuronas del producto del sistema nervioso. Los animales se alojaron en condiciones estándar con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, con el acceso ilimitado a comida y agua. El estableo se llevó a cabo según las directrices éticas (European Communities Council Directive 86/609/EEC) aprobado por el comité ético local.

5 Extracción de ADN total

El ADN total fue aislado de muestras humanas de la corteza entorrinal y la sustancia negra (Tabla 7) utilizando el *kit de Sangre y Tejido DNeasy* (Qiagen, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN total murino fueron obtenidas de la corteza frontal usando el mismo procedimiento.

Tratamiento con bisulfito

10 Se trataron trescientos nanogramos de ADN con bisulfito usando el *kit EZ DNA Methylation* (Zymo Research, Ecogen, Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ADN tratado con bisulfito se resuspendió en 30µl para llegar a una concentración final de 10ng/µl. 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 de bucle D y ND1

15 Los cebadores para el experimento de 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 (*Clave*) de cuatro bases) en el Lote 5 -oligonucleótido rpima, más una secuencia específica para el molde en el 3' - final primera. Por otra parte, se añadió una secuencia MID (*identificador múltiple*)  
 20 entre el cebador A (o cebador B) y la secuencia específica para la posterior identificación automatizada de las muestras con el software después de las etapas de agrupación/multiplexado y secuenciación. Los cebadores utilizados contenían los siguientes componentes: Cebador directo (Cebador A-Clave-MID-molde de la secuencia específica), 5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA (SEQ ID NO: 33) - -MID TCAG - secuencia molde específica 3'; Cebador inverso (Cebador B- Clave-MID-secuencia molde específica): 5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC (SEQ ID NO: 34)- MID  
 25 TCAG- secuencia molde específica-3'. Las secuencias molde específicas para cada uno de los amplicones: bucle D-directo, 5'-TAGGGGTTTTTGGATTATTATTTTT-3' (SEQ ID NO: 2) y bucle D-inverso, 5'-ACAAACATTCAATTATTATTATATCCT-3' (SEQ ID NO: 3); ND1-directo, 5'-ATGGTAAATTTTTATTTTTATTGTATTT-3' (SEQ ID NO: 4) y ND1-inverso, 5'-TAATTTAAATTTAATACTCACCTAATCAA-3' (SEQ ID NO: 5). Los cebadores utilizados en este estudio fueron  
 30 diseñados para evitar los sitios CpG. La secuencia específica de los MID para cada paciente se indica en la Tabla 8. Las regiones amplificadas (bucle D: 16386-256; ND1: 3313-3686) se basan en la posición de nucleótidos del mapa del ADNmt humano ([www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)).

Preparación de la biblioteca de amplicones

35 Las PCR para los amplicones del bucle D y ND1 se realizaron siguiendo el manual *Amplicon Library Preparation Method Manual (GS FLX Titanium Series)* de Roche. Para las PCR se utilizaron veinte nanogramos de ADN total tratado con bisulfito. La amplificación del ADN tratado bisulfito se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25µl. Cada reacción de PCR consistió en: 1x de FastStart 10x Buffer no. 2, 0,05U/µl de polimerasa *FastStart HiFi Polymerase* (Roche), 200 nM de cada dNTP, y 200 nM de cada cebador específico *directo* e *inverso*. Los cebadores se sintetizaron con una calidad de purificación HPLC (Sigma - Aldrich, Madrid, España). Las amplificaciones se  
 40 llevaron a cabo en un termociclador *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 de hibridación (61 °C ND1 , y 62 °C bucle D) durante 45s y 72°C durante 1 min, seguido por una etapa 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 teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain al 1,5 % (Invitrogen, Madrid, España).

45 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 el manual de instrucciones de Roche *Amplicon Library Preparation Method Manual (GS FLX Titanium Series)*.

Cuantificación de las bibliotecas de amplicones y secuenciación de FLX

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

## Selección de los sitios diferencialmente metilados

El alineamiento y la identificación de los sitios CpG, CHG, y CHH y las tasas de conversión de bisulfito se realizaron usando 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>).

- 5 La selección de los sitios diferencialmente metilados se basó en el cálculo del ensayo estadístico exacto de Fisher, considerando aquellos sitios diferencialmente metilados con un valor p ajustado usando el método de Benjamini y Hochberg (1995) por debajo de 0,05. El valor  $\beta$  representado en los gráficos de mapas de calor es la relación de las secuencias metiladas respecto a la suma global de las secuencias metiladas y no metiladas por sitio (Du et al., 2010, BMC Bioinformatics, 30;11:587), es decir  $\beta_{i,j} = M/(M + O)$  donde M es el número de secuencias metiladas en el sitio (i) y MID (j), y O 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 de bucle D y reducida en el gen ND1 en casos con estadios tempranos de patología relacionada con EA

Se observó un incremento de la metilación en sitios CpG y no CpG (CHG y CHH) en la región de bucle D en los casos con patología relacionada con EA de estadios I/II y III/IV de Braak (Fig. 1).

- 15 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 log<sub>2</sub> (OR) (Fig. 2). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la metilación de los sitios CHH entre los controles y los casos con patología relacionada con EA en las etapas III/IV.

- 20 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 comparado con las muestras control (log<sub>2</sub> [O] > 0, Fig. 3). No se encontraron diferencias para los sitios CHH.

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

- 25 En contraste con lo observado en la corteza entorrinal en EA, la región de bucle D 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 metilación del ADN está incrementada en la región de bucle D en modelos murinos de EA.

- 30 En este estudio, se usaron ratones APP/PS1 (modelo murino de EA) de seis meses de edad (n = 4) y ratones control de la misma edad (n = 4). Como puede observarse en la Figura 4A, los sitios CpG mostraron hipermetilación en muestras obtenidas de patología de modelos de ratón con respecto a las muestras control. Estos resultados también se observaron en sitios CHG (véase la Figura 4B).

- 35 Para determinar el patrón de metilación como avance de EA, emplearon ratones APP/PS1 de tres, seis y doce meses. A los tres meses, los ratones APP/PS1 tienen un grado bajo de acumulación de placas neuríticas, que se incrementa en ratones APP/PS1 de seis meses de edad. Los ratones del modelo EA de seis meses de edad muestran fallos cognitivos y de memoria. Finalmente, los animales APP/PS1 de 12 meses muestran síntomas similares a los observados en seres humanos en estadios avanzados de EA.

- 40 El análisis del grado de metilación en la región de bucle D corroboró el patrón observado en muestras de tejido cerebral humano. Como se muestra en la Figura 5, se observó una tendencia a la hipometilación de los sitios CpG CHG y CHH en los ratones del modelo en estadios avanzados de EA con respecto a dichos sitios CpG, CHG y CHH en ratones del modelo en estadios tempranos de EA (Figura 5A, 5B y 5C).

Ejemplo 4: la presencia de la posición polimórfica 16519 en el ADN mitocondrial está asociada con el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

- 45 Los resultados mostrados en la Tabla 9 muestran que la presencia del polimorfismo T16519C está asociada con la enfermedad de Alzheimer. Dichos resultados se obtuvieron mediante secuenciación convencional y usando un ensayo de chi cuadrado.

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

Tipo de muestra y numero de muestras analizadas	Presencia de polimorfismo T16519C	Valor de p
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

5 Se observó la presencia de heteroplasmia en algunos casos y se realizó de nuevo el genotipado de las muestras usando PCR-RFLP. La presencia del alelo C genera una diana de restricción para la enzima de restricción HaeIII. Se llevó a cabo la amplificación de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 30 empleando oligonucleótidos SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32. Se obtuvieron los siguientes patrones de bandas dependiendo del genotipo:  
Genotipo T: 183 pb, 318 pb

**Listado de secuencias**

- 10 <110> INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÉDICA DE BELLVITGE (IDIBELL)  
<120> MARCADORES MITOCONDRIALES DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS
- 15 <130> P10635PC00  
<150> ES P201430444  
<151> 28-03-2014
- 20 <160> 34  
<170> PatentIn versión 3.5
- 25 <210> 1  
<211> 16569  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens
- 30 <220>  
<221> característica\_misc  
<222> (3107)..(3107)  
<223> n es a, c, g, o t
- 35 <400> 1

ES 2 744 592 T3

gatcacaggt ctatcaccct attaaccact cacgggagct ctccatgcat ttggatattt	60
cgtctggggg gtatgcacgc gatagcattg cgagacgctg gagccggagc accctatgtc	120
gcagtatctg tctttgattc ctgcctcatc ctattattta tcgcacctac gttcaatatt	180
acaggcgaac atacttacta aagtgtgtta attaattaat gcttgtagga cataataata	240
acaattgaat gtctgcacag ccactttcca cacagacatc ataacaaaaa atttccacca	300
aacccccct cccccgcttc tggccacagc acttaaacac atctctgcca aacccccaaa	360
acaaagaacc ctaacaccag cctaaccaga tttcaaattt tatcttttgg cggtatgac	420
ttttaacagt caccccccaa ctaacacatt attttcccct cccactcca tactactaat	480
ctcatcaata caacccccgc ccatcctacc cagcacacac acaccgctgc taacccccata	540
ccccgaacca accaaacccc aaagacaccc cccacagttt atgtagctta cctcctcaaa	600
gcaatacact gaaaatgttt agacgggctc acatcacccc ataaacaaat aggtttggtc	660
ctagcctttc tattagctct tagtaagatt acacatgcaa gcatccccgt tccagtgagt	720
tcaccctcta aatcaccacg atcaaaagga acaagcatca agcacgcagc aatgcagctc	780
aaaacgctta gcctagccac acccccacgg gaaacagcag tgattaacct ttagcaataa	840
acgaaagttt aactaagcta tactaaccac agggttggtc aatttcgtgc cagccaccgc	900
ggtcacacga ttaacccaag tcaatagaag ccggcgtaaa gagtgtttta gatcaccccc	960
tccccataaa agctaaaact cacctgagtt gtaaaaaact ccagttgaca caaaatagac	1020
tacgaaagtg gctttaacat atctgaacac acaatagcta agaccctaac tgggattaga	1080
taccacctta tgcttagccc taaacctcaa cagttaaact aacaaaactg ctgccagaa	1140
cactacgagc cacagcttaa aactcaaagg acctggcggg gcttcatatc cctctagagg	1200
agcctgttct gtaatcgata aaccccgatc aacctcacca cctcttgctc agcctatata	1260

ES 2 744 592 T3

ccgccatctt cagcaaacc t gatgaaggc tacaagtaa gcgcaagtac ccacgtaaag 1320  
 acgtaggtc aaggtgtagc ccatgaggtg gcaagaaatg ggctacattt tctacccag 1380  
 aaaactacga tagcccttat gaaacttaag ggtcgaaggt ggatttagca gtaaactaag 1440  
 agtagagtgc ttagttgaac agggccctga agcgcgtaca caccgccctg caccctctc 1500  
 aagtatactt caaaggacat ttaactaaaa cccctacgca ttatataga ggagacaagt 1560  
 cgtaacatgg taagtgtact ggaaagtgca cttggacgaa ccagagtgtg gcttaacaca 1620  
 aagcacccaa cttacactta ggagatttca acttaacttg accgctctga gctaaccta 1680  
 gccccaaacc cactccact tactaccaga caaccttagc caaaccttt acccaataa 1740  
 agtataggcg atagaaattg aaacctggcg caatagatat agtaccgca gggaaagatg 1800  
 aaaaattata accaagcata atatagcaag gactaacccc tataccttct gcataatgaa 1860  
 ttaactagaa ataactttgc aaggagagcc aaagctaaga cccccgaaac cagacgagct 1920  
 acctaagaac agctaaaaga gcacaccctg ctatgtagca aaatagtggg aagatttata 1980  
 ggtagaggcg acaaacttac cgagcctggt gatagctggt tgtccaagat agaacttag 2040  
 ttcaacttta aatttgccca cagaaccctc taaatcccct tgtaaattta actgttagtc 2100  
 caaagaggaa cagctctttg gacactagga aaaaaccttg tagagagagt aaaaaattta 2160  
 acacccatag taggcctaaa agcagccacc aattaagaaa gcgttcaagc tcaacacca 2220  
 ctacctaaaa aatcccaaac atataactga actcctcaca cccaattgga ccaatctatc 2280  
 accctataga agaactaatg ttagtataag taacatgaaa acattctcct ccgcataagc 2340  
 ctgctcaga ttaaaact gaactgacaa ttaacagccc aatatctaca atcaaccaac 2400  
 aagtcattat taccctcact gtcaaccaa cacaggcatg ctcataagga aaggttaaaa 2460  
 aaagtaaaag gaactcggca aatcttacc cgctgttta ccaaaaacat cacctctagc 2520  
 atcaccagta ttagaggcac cgctgcccc gtgacacatg tttaacggcc gcggtaccct 2580  
 aaccgtgcaa aggtagcata atcacttggt ccttaaatag ggacctgtat gaatggctcc 2640  
 acgagggttc agctgtctct tacttttaac cagtgaatt gacctgccg tgaagaggcg 2700  
 ggcataacac agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaat gcaaacagta 2760  
 cctaacaac ccacaggtcc taaactacca aacctgcatt aaaaatttcg gttggggcga 2820  
 cctcggagca gaaccaacc tccgagcagt acatgctaag acttaccag tcaaagcgaa 2880  
 ctactatact caattgatcc aataacttga ccaacggaac aagttaccct agggataaca 2940  
 gcgcaatcct attctagagt ccatatcaac aatagggttt acgacctcga tgttgatca 3000  
 ggacatcccg atggtgcagc cgctattaa ggttcgttt ttcaacgatt aaagtcctac 3060  
 gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctacntt aaattcctcc 3120  
 ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa gcgccttccc ccgtaaatga 3180  
 tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc 3240  
 agagcccggg aatcgcataa aacttaaac tttacagtca gaggttcaat tcctcttctt 3300

ES 2 744 592 T3

aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcatgtac ccattctaata cgcaatggca 3360  
ttcctaatac ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggcccaac 3420  
gttgtaggcc cctacgggct actacaacce ttcgctgagc ccataaaact cttcaccaaa 3480  
gagcccctaa aaccgcccac atctaccatc accctctaca tcaccgccc gaccttagct 3540  
ctcaccatcg ctcttctact atgaaccccc ctccccatac ccaaccccct ggtcaacctc 3600  
aacctaggcc tcctatttat tctagccacc tctagcctag ccgtttactc aatcctctga 3660  
tcaggggtgag catcaaactc aaactacgcc ctgatcggcg cactgcgagc agtagcccaa 3720  
acaatctcat atgaagtac cctagccatc attctactat caacattact aataagtggc 3780  
tcctttaacc tctccaccct tatcacaaca caagaacacc tctgattact cctgcatca 3840  
tgacccttgg ccataatatg atttatctcc acactagcag agaccaaccg aacccccttc 3900  
gaccttgccg aaggggagtc cgaactagtc tcaggcttca acatcgaata cgccgaggc 3960  
cccttcgccc tattcttcat agccgaatac acaaacatta ttataataaa caccctcacc 4020  
actacaatct tcctaggaac aacatagac gcactctccc ctgaactcta cacacatat 4080  
tttgtcacca agaccctact tctaacctcc ctgttcttat gaattcgaac agcatacccc 4140  
cgattccgct acgaccaact catacacctc ctatgaaaaa acttcctacc actcaccta 4200  
gcattactta tatgatatgt ctccataccc attacaatct ccagcattcc ccctcaaacc 4260  
taagaaatat gtctgataaa agagttactt tgatagagta aataatagga gcttaaacc 4320  
ccttatttct aggactatga gaatcgaacc catccctgag aatccaaaat tctccgtgcc 4380  
acctatcaca ccccatccta aagtaaggtc agctaaataa gctatcgggc ccataccccg 4440  
aaaatgttgg ttataccctt cccgtactaa ttaatcccct ggccaacc gtcacttact 4500  
ctaccatctt tgcaggcaca ctcatcacag cgctaaagtc gcactgattt ttacctgag 4560  
taggcctaga aataaacatg ctagctttta ttccagttct aaccaaaaaa ataaaccctc 4620  
gttcacaga agctgccatc aagtatttcc tcacgcaagc aaccgcatcc ataactcttc 4680  
taatagctat cctcttcaac aatatactct ccggacaatg aaccataacc aatactacca 4740  
atcaatactc atcattaata atcataatag ctatagcaat aaaactagga atagccccct 4800  
ttcacttctg agtcccagag gttacccaag gcacccctct gacatccggc ctgcttcttc 4860  
tcacatgaca aaaactagcc cccatctcaa tcatatacca aatctctccc tcaactaaag 4920  
taagccttct cctcactctc tcaatcttat ccatcatagc aggcagttga ggtggattaa 4980  
accaaaccca gctacgcaaa atcttagcat actcctcaat taccacata ggatgaataa 5040  
tagcagttct accgtacaac cctaacataa ccattcttaa tttactatt tatattatcc 5100  
taactactac cgatttcta ctactcaact taaactccag caccacgacc ctactactat 5160  
ctcgacctg aaacaagcta acatgactaa caccctaat tccatccacc ctctctccc 5220  
taggaggcct gccccgcta accggctttt tgcccaaatg ggccattatc gaagaattca 5280  
caaaaacaa tagcctcatc atccccacca tcatagccac catcacctc cttaacctct 5340

ES 2 744 592 T3

acttctacct	acgcctaatc	tactccacct	caatcacact	actccccata	tctaacaacg	5400
taaaaataaa	atgacagttt	gaacatacaa	aaccacccc	attcctccc	acactcatcg	5460
cccttaccac	gctactccta	cctatctccc	cttttatact	aataatctta	tagaaattta	5520
ggttaaatac	agaccaagag	ccttcaaagc	cctcagtaag	ttgcaatact	taatttctgt	5580
aacagctaag	gactgcaaaa	ccccactctg	catcaactga	acgcaaatca	gccactttaa	5640
ttaagctaag	cccttactag	accaatggga	cttaaaccca	caaacactta	gttaacagct	5700
aagcaccta	atcaactggc	ttcaatctac	ttctcccgcc	gccgggaaa	aaggcgggag	5760
aagccccggc	aggtttgaag	ctgcttcttc	gaatttgcaa	ttcaatatga	aaatcacctc	5820
ggagctggta	aaaagaggcc	taaccctgt	ctttagattt	acagtccaat	gcttcaactca	5880
gccatthttac	ctcaccccca	ctgatgttcg	ccgaccgttg	actattctct	acaaaccaca	5940
aagacattgg	aacactatac	ctattattcg	gcgcatgagc	tggagtccta	ggcacagctc	6000
taagcctcct	tattcgagcc	gagctgggcc	agccaggcaa	ccttctaggt	aacgaccaca	6060
tctacaacgt	tatcgtcaca	gccatgcat	ttgtaataat	cttcttcata	gtaataccca	6120
tcataatcgg	aggctttggc	aactgactag	ttccccta	aatcggtgcc	cccgatatgg	6180
cgtttccccg	cataaacaac	ataagcttct	gactcttacc	tccctctctc	ctactcctgc	6240
tcgcatctgc	tatagtggag	gccggagcag	gaacaggttg	aacagtctac	cctcccttag	6300
cagggaaacta	ctcccacct	ggagcctccg	tagacctaac	catcttctcc	ttacacctag	6360
caggtgtctc	ctctatctta	ggggccatca	atctcatcac	aacaattatc	aatataaaac	6420
ccctgccat	aaccaatac	caaacgccc	tcttcgtctg	atccgtccta	atcacagcag	6480
tcctacttct	cctatctctc	ccagtcctag	ctgctggcat	cactatacta	ctaacagacc	6540
gcaacctcaa	caccaccttc	ttcgaccccg	ccggaggagg	agacccatt	ctataccaac	6600
acctattctg	atthttcggg	caccctgaag	tttatattct	tatcctacca	ggcttcgga	6660
taatctcca	tattgtaact	tactactccg	gaaaaaaga	accatttggg	tacataggta	6720
tggctctgagc	tatgatatac	attggcttcc	tagggtttat	cggtgtgagca	caccatata	6780
ttacagtagg	aatagacgta	gacacacgag	catattcac	ctccgtacc	ataatcatcg	6840
ctatccccac	cggcgtcaaa	gtatttagct	gactcggcac	actccacgga	agcaatatga	6900
aatgatctgc	tgcagtgtct	tgagccctag	gattcatctt	tcttttcacc	gtaggtggcc	6960
tgactggcat	tgtattagca	aactcatcac	tagacatcgt	actacacgac	acgtactacg	7020
ttgtagccca	cttccactat	gtcctatcaa	taggagctgt	atttgccatc	ataggaggct	7080
tcattcactg	atthccccta	ttctcaggct	acaccctaga	ccaaacctac	gccaaaatcc	7140
atthcactat	catattcatc	ggcgtaaadc	taactttctt	cccacaacac	tttctcggcc	7200
tatccggaat	gccccgacgt	tactcggact	accccgatgc	atacaccaca	tgaaacatcc	7260
tatcatctgt	aggctcattc	atthctctaa	cagcagtaat	attaataatt	ttcatgattt	7320
gagaagcctt	cgcttcgaag	cgaaaagtcc	taatagtaga	agaaccctcc	ataaacctgg	7380

ES 2 744 592 T3

agtgactata tggatgcccc ccaccctacc acacattcga agaaccgta tacataaaat	7440
ctagacaaaa aaggaaggaa tcgaaccccc caaagctggt ttcaagcaa ccccatggcc	7500
tccatgactt tttcaaaaag gtattagaaa aaccatttca taactttgtc aaagttaa	7560
tataggctaa atcctatata tcttaatggc acatgcagcg caagtaggtc tacaagacgc	7620
tacttcccct atcatagaag agcttatcac ctttcatgat cagccctca taatcattt	7680
ccttatctgc ttctagtcc tgtatgccct tttcctaaca ctcaacaaca aactaactaa	7740
tactaacatc tcagacgctc aggaaataga aaccgtctga actatcctgc ccgccatcat	7800
cctagtctc atcgccctcc catccctacg catcctttac ataacagacg aggtcaacga	7860
tccctccctt accatcaaat caattggcca ccaatggtac tgaacctacg agtacaccga	7920
ctacggcgga ctaatcttca actcctacat acttccccca ttattcctag aaccaggcga	7980
cctgcgactc cttgacgctt acaatcgagt agtactcccg attgaagccc ccattcgtat	8040
aataattaca tcacaagacg tcttgactc atgagctgtc cccacattag gcttaaaaac	8100
agatgcaatt cccggacgtc taaaccaaac cactttcacc gctacacgac cgggggtata	8160
ctacggtcaa tgctctgaaa tctgtggagc aaaccacagt ttcattgcca tcgtcctaga	8220
attaattccc ctaaaaatct ttgaaatagg gcccgatatt accctatagc accccctcta	8280
ccccctctag agccactgt aaagctaact tagcattaac cttttaagtt aaagattaag	8340
agaaccaaca cctctttaca gtgaaatgcc ccaactaat actaccgtat ggcccacat	8400
aattaccccc atactcctta cactattcct catcaccaa ctaaaaatat taaacacaaa	8460
ctaccaccta cctccctcac caaagcccat aaaaataaaa aattataaca aaccctgaga	8520
acaaaaatga acgaaaatct gttcgcttca ttattgccc ccacaatcct aggcctacc	8580
gccgcagtac tgatcattct atttcccct ctattgatcc ccacctcaa atatctcatc	8640
aacaaccgac taatcaccac ccaacaatga ctaatcaaac taacctcaa acaaatgata	8700
accatacaca aactaaagg acgaacctga tctcttatac tagtatcctt aatcattttt	8760
attgccacaa ctaacctcct cggactcctg cctcactcat ttacaccaac cacccaacta	8820
tctataaacc tagccatggc catcccctta tgagcgggca cagtgattat aggccttcgc	8880
tctaagatta aaaatgccct agcccacttc ttaccacaag gcacacctac accccttatc	8940
cccatactag ttattatcga aaccatcagc ctactcattc aaccaatagc cctggccgta	9000
cgctaaaccg ctaacattac tgcaggccac ctactcatgc acctaattgg aagcgcacc	9060
ctagcaatat caaccattaa ccttccctct acacttatca tcttcacaat tctaattcta	9120
ctgactatcc tagaaatcgc tgtcgcctta atccaagcct acgttttcac acttctagta	9180
agcctctacc tgcacgacaa cacataatga cccaccaatc acatgcctat catatagtaa	9240
aaccagccc atgaccctta acaggggccc tctcagccct cctaatgacc tccggcctag	9300
ccatgtgatt tcacttccac tccataacgc tctcatact aggcctacta accaacacac	9360
taaccatata ccaatgatgg cgcgatgtaa cacgagaaag cacataccea ggccaccaca	9420

ES 2 744 592 T3

caccacctgt ccaaaaaggc cttcgatacg ggataatcct atttattacc tcagaagttt 9480  
ttttcttcgc aggatTTTTc tgagcctttt accactccag cctagcccct acccccctaat 9540  
taggagggca ctggcccca acaggcatca ccccgctaaa tcccctagaa gtcccactcc 9600  
taaacacatc cgtattactc gcatcaggag tatcaatcac ctgagctcac catagtctaa 9660  
tagaaaacaa ccgaaaccaa ataattcaag cactgcttat tacaatttta ctgggtctct 9720  
atTTTaccct cctacaagcc tcagagtact tcgagtctcc cttcaccatt tccgacggca 9780  
tctacggctc aacatTTTTt gttagccacag gcttccacgg acttcacgtc attattggct 9840  
caactttcct cactatctgc ttcacccgcc aactaatatt tcactttaca tccaaacatc 9900  
actttggctt cgaagccgcc gcctgatact ggcattttgt agatgtgggt tgactatttc 9960  
tgtatgtctc catctattga tgagggtctt actcttttag tataaatagt accgttaact 10020  
tccaattaac tagttttgac aacattcaaa aaagagtaat aaacttcgcc ttaattttaa 10080  
taatcaacac cctcctagcc ttactactaa taattattac atTTTgacta ccacaactca 10140  
acggctacat agaaaaatcc accccttacg agtgcggctt cgaccctata tccccgcc 10200  
gCGTcccttt ctccataaaa tcttcttag tagctattac cttcttatta tttgatctag 10260  
aaattgccct ccttttacc caccatgag ccctacaaac aactaacctg cactaatag 10320  
ttatgtcatc cctcttatta atcatcatcc tagccctaag tctggcctat gagtgactac 10380  
aaaaaggatt agactgaacc gaattggat atagtttaa caaacgaat gatttcgact 10440  
cattaaatta tgataatcat atttacaaa tgcccctcat ttacataaat attatactag 10500  
catttaccat ctacttcta ggaatactag tatatcgctc acacctcata tctccctac 10560  
tatgcctaga aggaataata ctatcgctgt tcattatagc tactctcata accctcaaca 10620  
cccactccct cttagccaat attgtgccta ttgccatact agtctttgcc gcctgcgaag 10680  
cagcggtaggg cctagcccta ctagtctcaa tctcaacac atatggccta gactacgtac 10740  
ataacctaaa cctactccaa tgctaaaact aatcgctcca acaattatat tactaccact 10800  
gacatgactt tccaaaaaac acataattg aatcaacaca accaccaca gcctaattat 10860  
tagcatcatc cctctactat ttttaacca aatcaacaac aacctattta gctgttcccc 10920  
aaccttttcc tccgaccccc taacaacccc cctcctaata ctaactacct gactcctacc 10980  
cctcacaatc atggcaagcc aacgccactt atccagtga cactatcac gaaaaaac 11040  
ctacctctct atactaatct ccctacaaat ctcttaatt ataacattca cagccacaga 11100  
actaatcata ttttatatct tcttcgaaac cacacttatc cccacctgg ctatcatcac 11160  
ccgatgaggc aaccagccag aacgcctgaa cgcaggcaca tacttctat tctacaccct 11220  
agtaggctcc cttcccctac tcatgcact aatttact cacaacacc taggctcact 11280  
aaacattcta ctactcactc tcactgcca agaactatca aactcctgag ccaacaactt 11340  
aatatgacta gcttacaaa tagcttttat agtaagata cctctttacg gactccactt 11400  
atgactccct aaagcccatg tcgaagcccc catcgctggg tcaatagtac ttgccgagt 11460

ES 2 744 592 T3

actcttaaaa ctaggcggct atggataat acgcctcaca ctcatttca accccctgac 11520  
 aaaacacata gcctaccctt tccttgact atccctatga ggcataatta taacaagctc 11580  
 catctgcta cgacaaacag acctaaaac gctcattgca tactcttcaa tcagccacat 11640  
 agccctcgta gtaacagcca ttctcatcca aacccctga agcttcaccg ggcgagtcac 11700  
 tctcataatc gccacgggc ttacatcctc attactattc tgcttagcaa actcaacta 11760  
 cgaacgcact cacagtcgca tcataatcct ctctcaagga cttcaaactc tactcccact 11820  
 aatagctttt tgatgacttc tagcaagcct cgctaacctc gccttaccct ccactattaa 11880  
 cctactggga gaactctctg tgctagtaac cacgttctcc tgatcaaata tcactctcct 11940  
 acttacagga ctcaacatac tagtcacagc cctatactcc ctctacatat ttaccacaac 12000  
 acaatggggc tcaactaccc accacattaa caacataaaa ccctcattca cacgagaaaa 12060  
 caccctcatg ttcatacacc tatccccat tctcctccta tccctcaacc cgcacatcat 12120  
 taccggggtt tcctcttgta aatatagttt aaccaaaca tcagattgtg aatctgacaa 12180  
 cagaggctta cgaccctta tttaccgaga aagctcaca gaactgctaa ctcatgcccc 12240  
 catgtctaac aacatggctt tctcaacttt taaaggataa cagctatcca ttggtcttag 12300  
 gcccaaaaa ttttggtgca actcaaata aaagtaataa ccatgcacac tactataacc 12360  
 accctaacc tgacttcctt aattcccc atccttacca ccctcgtaa cctaacaaa 12420  
 aaaaactcat accccatta tgtaaaatcc attgtcgcac ccaccttat tadcagtctc 12480  
 ttccccaca caatattcat gtgcctagac caagaagtta ttatctcga ctgacactga 12540  
 gccacaacc aaacaacca gctctccta agcttcaaac tagactactt ctccataata 12600  
 ttcacccctg tagcattggt cgttacatgg tccatcatag aattctcact gtgatata 12660  
 aactcagacc caaacattaa tcagttcttc aaatatctac tcattctcct aattaccata 12720  
 ctaatcttag ttaccgctaa caacctattc caactgttca tcggctgaga gggcgtagga 12780  
 attatattct tcttgctcat cagttgatga tacgcccag cagatgcaa cacagcagcc 12840  
 attcaagcaa tcctatacaa ccgtatcggc gatatcgggt tcacctcgc cttagcatga 12900  
 tttatctac actcactc atgagacca caacaaatag cccttctaaa cgtaatacca 12960  
 agcctcacc cactactagg cctcctccta gcagcagcag gcaaatcagc ccaattaggt 13020  
 ctccaccct gactcccctc agccatagaa ggccccacc cagtctcagc cctactccac 13080  
 tcaagcacta tagttgtagc aggaatcttc ttactcatcc gcttccacc cctagcagaa 13140  
 aatagcccac taatccaaac tctaacta tgcttaggcg ctatcaccac tctgttcgca 13200  
 gcagtctgcg cccttacaca aaatgacatc aaaaaatcg tagccttctc cacttcaagt 13260  
 caactaggac tcataatagt tacaatcggc atcaaccaac cacacctagc attcctgcac 13320  
 atctgtacc acgccttctt caaagccata ctatttatgt gctccgggtc catcatccac 13380  
 aaccttaaca atgaacaaga tattcgaaaa ataggaggac tactcaaac catacctctc 13440  
 acttcaacct ccctcaccat tggcagccta gcattagcag gaataccttt cctcacaggt 13500

ES 2 744 592 T3

tctactcca aagaccacat catcgaaacc gcaaacatat catacaciaa cgctgagcc	13560
ctatctatta ctctcatcgc tacctccctg acaagcgct atagcactcg aataattctt	13620
ctcacctaa caggtaacc tcgcttcccc acccttacta acattaacga aaataacccc	13680
accctactaa accccattaa acgcttgga gccggaagcc tattcgcagg atttctcatt	13740
actaacaaca tttccccgc atcccccttc caaacaacia tccccctta cctaaaactc	13800
acagccctcg ctgtcacttt cctaggactt ctaacagccc tagacctcaa ctacctaacc	13860
aacaaactta aaataaaatc cccactatgc acattttatt tctccaacat actcggattc	13920
taccctagca tcacacaccg cacaatcccc tatctaggcc ttcttacgag caaaacctg	13980
cccctactcc tcctagacct aacctgacta gaaaagctat tacctaaaac aatttcacag	14040
caccaaactc ccacctcat catcacctca acccaaaaag gcataattaa actttacttc	14100
ctctctttct tcttcccact catcctaacc ctactcctaa tcacataacc tattccccgc	14160
agcaatctca attacaatat atacaccaac aaacaatggt caaccagtaa ctactactaa	14220
tcaacgcca taatcataca aagccccgc accaatagga tcctcccgaa tcaacctga	14280
cccctctctc tcataaatta ttcagcttcc tactactata aagtttacca caaccaccac	14340
cccatcatac tctttcacc acagaccaa tcctacctcc atcgctaacc cactaaaac	14400
actaccaag acctcaacc ctgaccccc tgctcagga tactcctcaa tagccatcgc	14460
tgtagtatat ccaaagacia ccatcattcc ccctaaataa attaaaaaa ctattaaacc	14520
catataacct ccccaaaat tcagaataat aacacaccg accacaccgc taacaatcaa	14580
tactaaacc ccataaatag gagaaggctt agaagaaaac cccaciaacc ccattactaa	14640
accacactc aacagaaaca aagcatacat cattattctc gcacggacta caaccacgac	14700
caatgatatg aaaaaccatc gttgtatttc aactacaaga acaccaatga cccaatagc	14760
caaaactaac cccctaataa aattaattaa ccactcattc atcgacctc ccacccatc	14820
caacatctcc gcatgatgaa acttcggctc actccttggc gcctgcctga tcctcaaat	14880
caccacagga ctattcttag ccatgcacta ctaccagac gcctcaaccg cttttcatc	14940
aatcgcccac atcactcgag acgtaaatta tggctgaatc atccgctacc ttcacgcaa	15000
tggcgcctca atattcttta tctgcctctt cctacacatc gggcgaggcc tatattacg	15060
atcatttctc tactcagaaa cctgaaacat cggcattatc ctctgcttg caactatagc	15120
aacagccttc ataggctatg tcctcccgty aggcaciaata tcattctgag gggccacagt	15180
aattaciaac ttactatccg ccatccata cattgggaca gacctagttc aatgaatctg	15240
aggaggctac tcagtagaca gtcccacct cacacgattc tttaccttc acttcatctt	15300
gcccttcatt attgcagccc tagcaacact ccacctcta ttcttgacg aaacgggatc	15360
aaaciaacccc ctaggaaatca cctccattc cgataaaatc acctccacc ctactacac	15420
aatciaaagac gccctcggct tactttctct cttctctcc ttaatgacat taacactatt	15480
ctcaccagac ctctaggcg acccagacia ttatacccta gccaacctt taacacccc	15540

ES 2 744 592 T3

tccccacatc aagccccgaat gatatttcct attgcctac acaattctcc gatccgtccc 15600  
 taacaaacta ggaggcgtcc ttgccctatt actatccatc ctcacctag caataatccc 15660  
 catcctccat atatccaaac aacaaagcat aatatttcgc ccactaagcc aatcacttta 15720  
 ttgactccta gccgcagacc tcctcattct aacctgaatc ggaggacaac cagtaagcta 15780  
 cccctttacc atcattggac aagtagcatc cgtactatac ttcacaacaa tcctaatacct 15840  
 aataccaact atctccctaa ttgaaaacaa aatactcaa tgggcctgtc cttgtagtat 15900  
 aaactaatac accagtcttg taaaccggag atgaaaacct tttccaagg acaaatcaga 15960  
 gaaaaagtct ttaactccac cattagcacc caaagctaag attctaattt aaactattct 16020  
 ctgttctttc atggggaagc agatttgggt accacccaag tattgactca cccatcaaca 16080  
 accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccaccatgaa tattgtacgg taccataaat 16140  
 acttgaccac ctgtagtaca taaaaacca atccacatca aaaccctc cccatgctta 16200  
 caagcaagta cagcaatcaa ccctcaacta tcacacatca actgcaactc caagccacc 16260  
 cctcaccac taggatacca acaaacctac ccaccctaa cagtacatag tacataaagc 16320  
 catttacgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtcccatgg atgaccccc 16380  
 tcagataggg gtcccttgac caccatcctc cgtgaaatca atatccgca caagagtgtct 16440  
 actctcctcg ctccgggcc ataacacttg ggggtagcta aagtgaactg tatccgacat 16500  
 ctggttccta cttcagggtc ataaagccta aatagccac acgttccct taaataagac 16560  
 atcacgatg 16569

<210> 2  
 <211> 25  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia de molde específica para el amplicón del bucle D

<400> 2

taggggttt ttgattatta tttt 25

15 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de molde específica para el amplicón del bucle D

<400> 3

25 acaaacatc aattattatt attatattcct 30

<210> 4  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 4

atggtaatt tttatttt tattgtatt 30

# ES 2 744 592 T3

<210> 5  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5  
<220>  
<223> secuencia de molde especifica para el amplicón de ND1

<400> 5

10  
taatttaaatt taataactca ccctaatcaa      30

<210> 6  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de MID

20  
<400> 6

acgagtgcggt      10

25  
<210> 7  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30  
<220>  
<223> Secuencia de MID

<400> 7

35  
acgctcgaca      10

<210> 8  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia de MID

45  
<400> 8

agacgcactc      10

<210> 9  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Secuencia de MID

55  
<400> 9

agcactgtag      10

60  
<210> 10  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

65  
<220>

<223> Secuencia de MID  
 <400> 10  
 5 atcagacacg 10  
 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 15 <400> 11  
 atatcgcgag 10  
 <210> 12  
 20 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Secuencia de MID  
 <400> 12  
 cgtgtctcta 10  
 30 <210> 13  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 <400> 13  
 40 ctccgctgtc 10  
 <210> 14  
 <211> 10  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 50 <400> 14  
 tagtatcagc 10  
 55 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 <400> 15  
 65 tctctatgcg 10

# ES 2 744 592 T3

<210> 16  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
5  
<220>  
<223> Secuencia de MID  
  
<400> 16  
10  
tgatagctct        10  
  
<210> 17  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
15  
<220>  
<223> Secuencia de MID  
20  
<400> 17  
  
tactgagcta        10  
25  
<210> 18  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
30  
<220>  
<223> Secuencia de MID  
  
<400> 18  
35  
catagtagtg        10  
  
<210> 19  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
40  
<220>  
<223> Secuencia de MID  
  
<400> 19  
45  
cgagagatac        10  
  
<210> 20  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
50  
<220>  
<223> Secuencia de MID  
  
<400> 20  
60  
atagcagcgtta        10  
  
<210> 21  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
65  
<220>

<223> Secuencia de MID  
 <400> 21  
 5 tcacgtacta 10  
 <210> 22  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 15 <400> 22  
 cgtctagtagc 10  
 <210> 23  
 20 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Secuencia de MID  
 <400> 23  
 tctacgtagc 10  
 30 <210> 24  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 <400> 24  
 40 tgtagctactc 10  
 <210> 25  
 <211> 10  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 50 <400> 25  
 acgactacag 10  
 55 <210> 26  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 <400> 26  
 65 cgtagactag 10

ES 2 744 592 T3

<210> 27  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 <400> 27  
 10  
 tacgagtatg 10  
 <210> 28  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 20  
 <400> 28  
 tactctcgtg 10  
 25  
 <210> 29  
 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Secuencia de MID  
 <400> 29  
 35  
 tagagacgag 10  
 <210> 30  
 <211> 502  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 30  
 ataccaaca acctaccac ccttaacagt acatagtaca taaagccatt taccgtacat 60  
 agcacattac agtcaaatcc cttctcgtcc ccatggatga cccccctcag ataggggtcc, 120  
 cttgaccacc atcctccgtg aaatcaatat cccgcacaag agtgctactc tcctcgtctc 180  
 gggcccataa cacttggggg tagctaaagt gaactgtatc cgacatctgg ttctacttc 240  
 agggtcataa agcctaaata gcccacacgt tccccttaa taagacatca cgatggatca 300  
 cagggtctatc accctattaa cactcacgg gagctctcca tgcatttggt attttcgtct 360  
 ggggggtatg cacgcgatag cattgcgaga cgctggagcc ggagcacct atgtcgcagt 420  
 atctgtcttt gattcctgcc tcctcctatt atttatcgca cctacgttca atattacagg 480  
 cgaacatact tactaaagtg tg 502  
 45  
 <210> 31  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> cebador directo para detectar el polimorfismo T16519C

# ES 2 744 592 T3

<400> 31  
5 ataccaacaa acctaccac cc 22  
<210> 32  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
10 <220>  
<223> cebador inverso para detectar el polimorfismo T16519C  
15 <400> 32  
ggcgaacata cttactaaag tgtg 24  
<210> 33  
<211> 21  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador A  
25 <400> 33  
cgtatcgct ccctcgccc a 21  
30 <210> 34  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
35 <220>  
<223> Cebador B  
<400> 34  
40 ctatgcttgcagccc c 21

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el riesgo de desarrollar 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 de bucle D, y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- 10 (iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,
- en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativa de que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Alzheimer o
- 15 en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D es indicativa de que el sujeto padece la enfermedad de Parkinson o de que el sujeto tiene un riesgo elevado de desarrollar la enfermedad de Parkinson.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D con respecto al patrón de metilación en un sujeto en estadio I-II de la enfermedad de Alzheimer es indicativa de que el sujeto padece la enfermedad de Alzheimer en estadio III-IV.
- 25 3. Método *in vitro* para seleccionar a un sujeto para someterlo a un tratamiento para prevenir la progresión de una enfermedad neurodegenerativa seleccionada de la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson en un sujeto que comprende:
- determinar en una muestra de dicho sujeto que contiene ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región de bucle D y/o en el gen ND1, en donde el patrón de metilación se determina en al menos un sitio seleccionado del grupo formado por:
- 30 i. los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- ii. los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- iii. los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- iv. los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- 35 v. los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5
- en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en el gen ND1 y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en el gen ND1 es indicativa de que el sujeto es un candidato para recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Alzheimer; o
- 40 en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D es indicativa de que el sujeto es un candidato para recibir un tratamiento dirigido a prevenir la enfermedad de Parkinson.
- 45 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:
- a) determinar en una muestra de dicho sujeto que comprende ADN mitocondrial el patrón de metilación en la región de bucle D, 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 en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5,
- b) comparar el patrón de metilación determinado en la etapa a) con dicho patrón de metilación obtenido en un estadio anterior de la enfermedad,
- en donde una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, una hipermetilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D, 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 a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad, es indicativa de la progresión de la enfermedad de Alzheimer; y
- en donde una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CpG en la región de bucle D, una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHG en la región de bucle D, y/o una hipometilación en al menos uno de dichos sitios CHH en la región de bucle D con respecto a dicho patrón de metilación determinado en un estadio anterior de la enfermedad es indicativa de la progresión de la enfermedad de Parkinson.
5. El método según la reivindicación 4, en donde el sujeto ha sido diagnosticado con la enfermedad de Alzheimer en estadio I-II o en donde el sujeto ha sido diagnosticado con la enfermedad de Parkinson en estadio III-V.
6. El método según las reivindicaciones 1 a 5, en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación de la metilación de todos los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1.
7. El método según las reivindicaciones 1 a 6, en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación de la metilación en todos los sitios CpG del gen ND1 mostrados en la Tabla 2.
8. El método según las reivindicaciones 1 a 7, en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación de la metilación de todos los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación del patrón de metilación de todos los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4.
10. El método según las reivindicaciones 1 a 9, en donde la determinación del patrón de metilación comprende la determinación de la metilación de todos los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 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-en-chip, conversión diferencial, restricción diferencial y peso diferencial del o de los sitios metilados.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el patrón de metilación se determina mediante pirosecuenciación.
13. Uso de un kit para determinar el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, en donde el kit comprende:
- al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente y de forma dependiente de metilación con una secuencia de ADN mitocondrial que comprende un sitio de metilación seleccionado del grupo formado por:
- (i) los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,
- (ii) los sitios CpG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 2;
- (iii) los sitios CHG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 3,
- (iv) los sitios CHG en el gen ND1 mostrados en la Tabla 4, y/o
- (v) los sitios CHH en la región de bucle D mostrados en la Tabla 5.
14. Uso de un kit para determinar el diagnóstico de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto seleccionada de la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, en donde el kit comprende al menos un oligonucleótido capaz de hibridar específicamente con una posición en la región 5' o 3' con respecto a un sitio de metilación en el ADN mitocondrial seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) los sitios CpG en la región de bucle D mostrados en la Tabla 1,

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

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

15. El uso de un kit según la reivindicación 14, 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.

A)

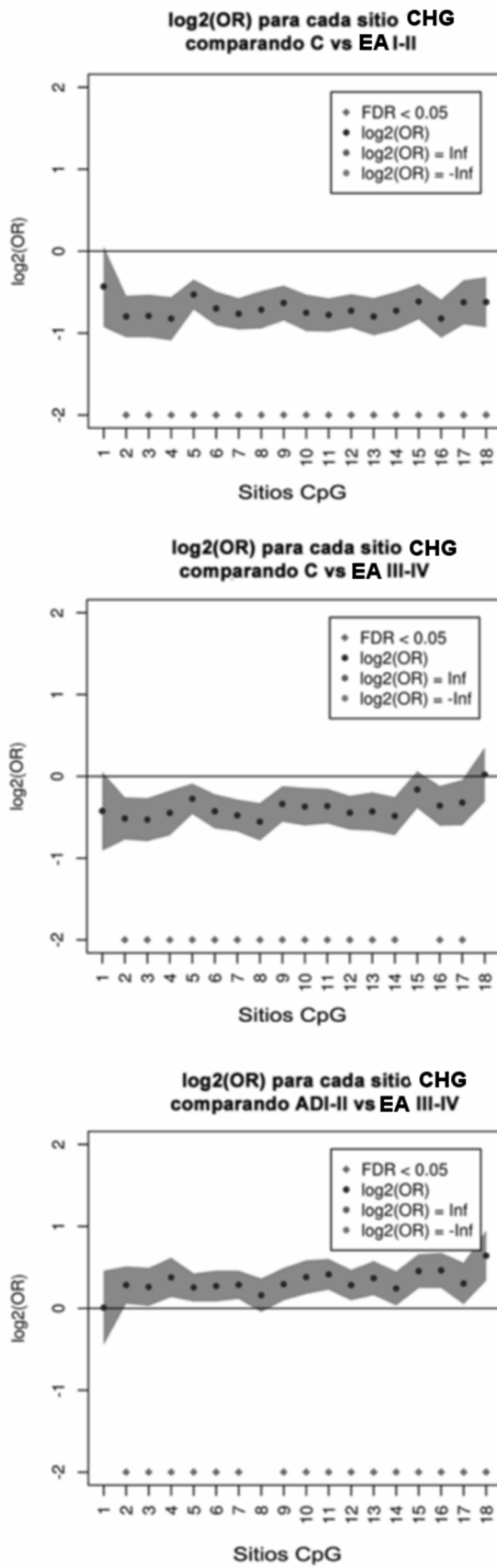


Figura 1

B)

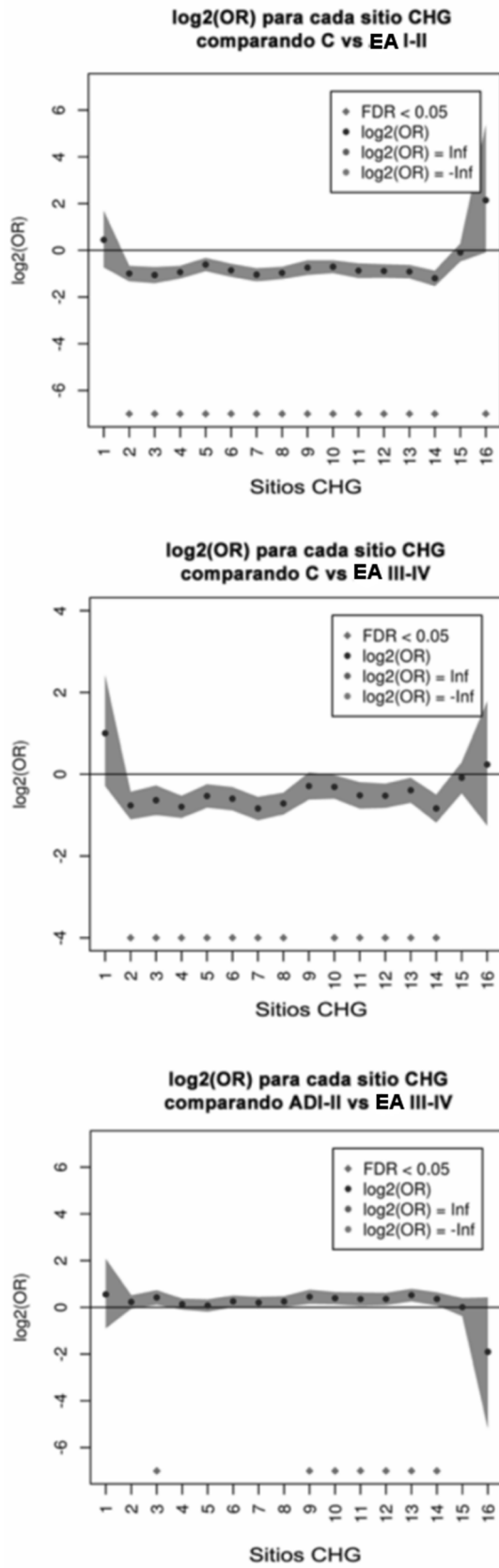


Figura 1 (cont.)

c)

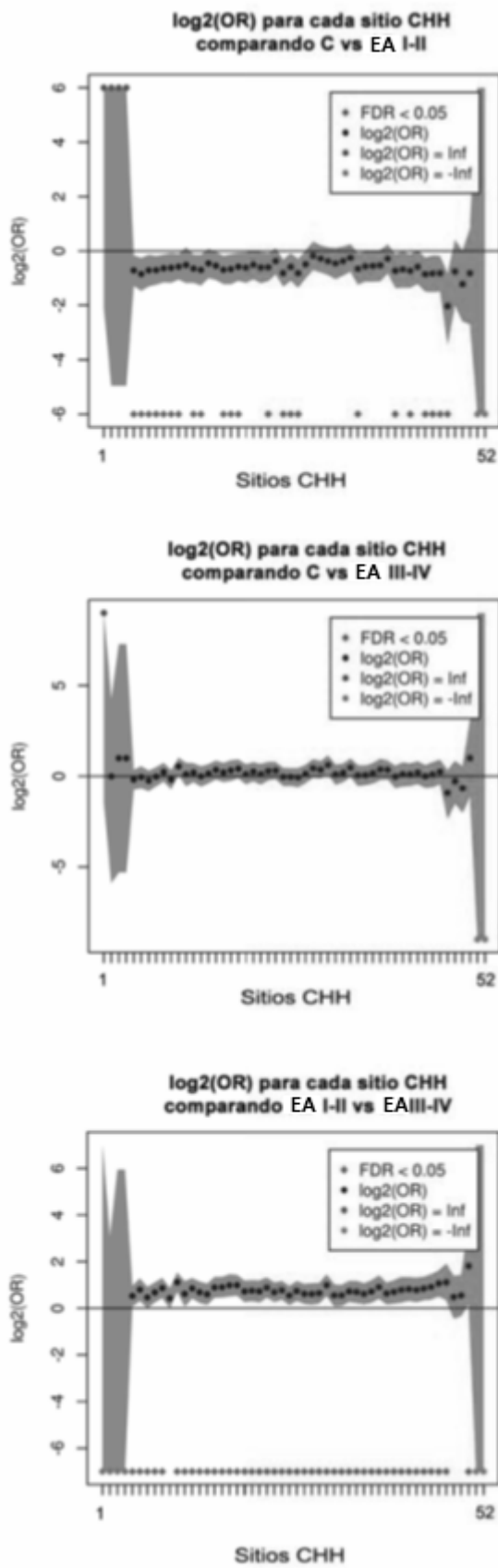


Figura 1 (cont.)

A)

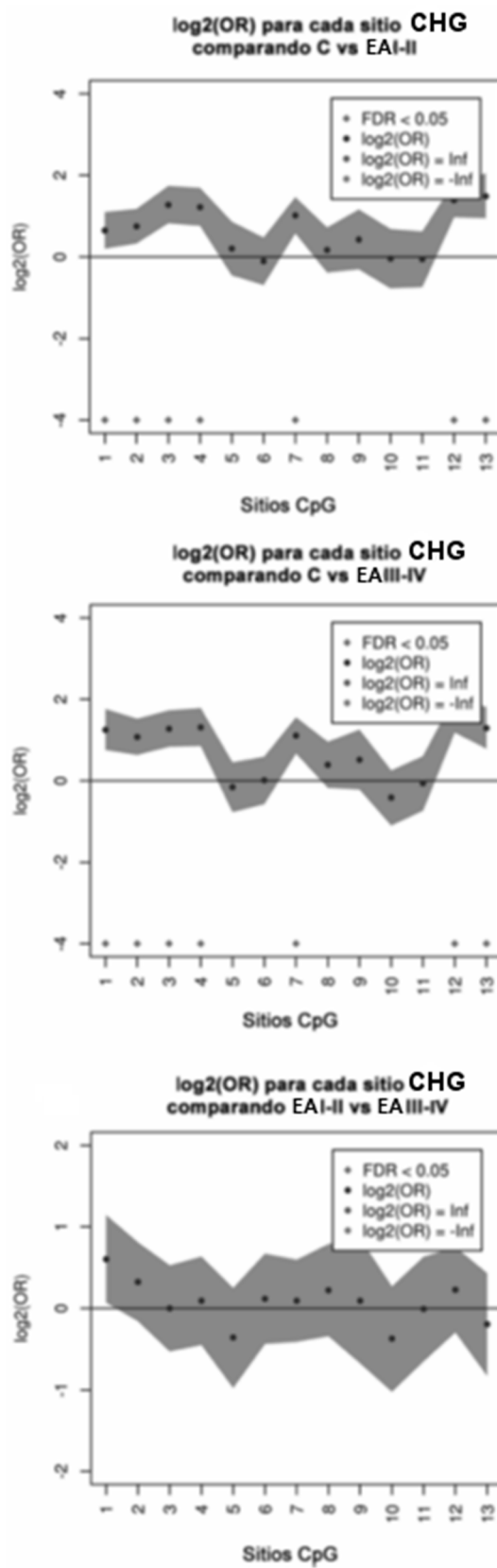


Figura 2

B)

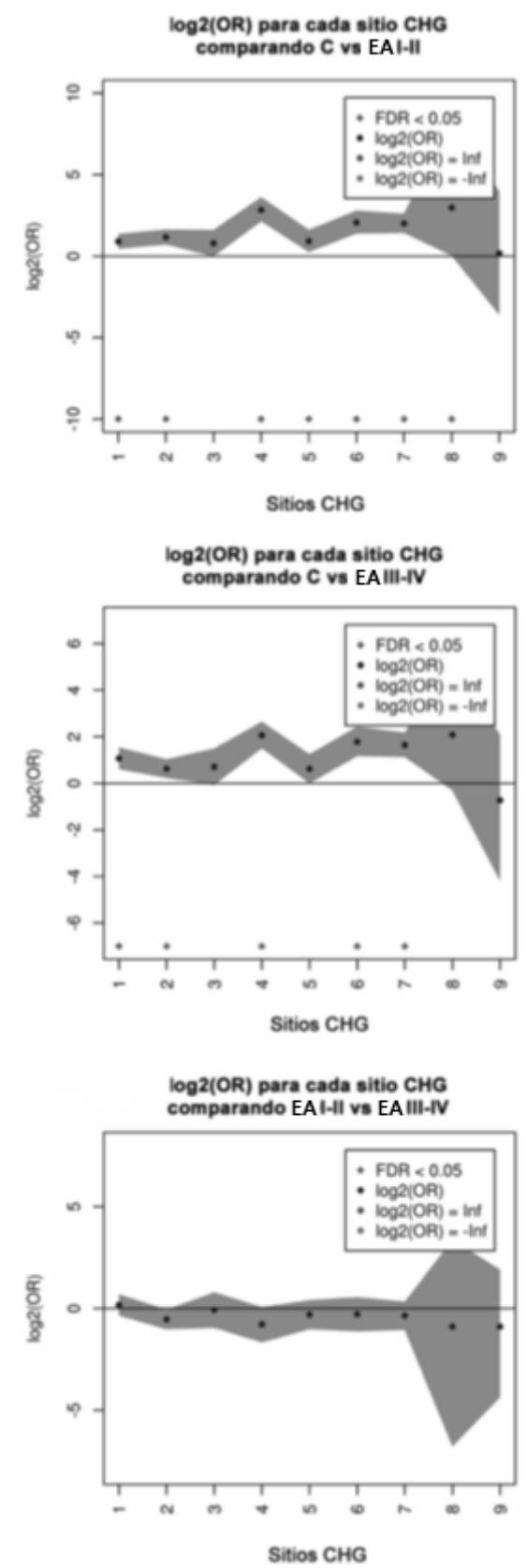


Figura 2 (cont.)

C)

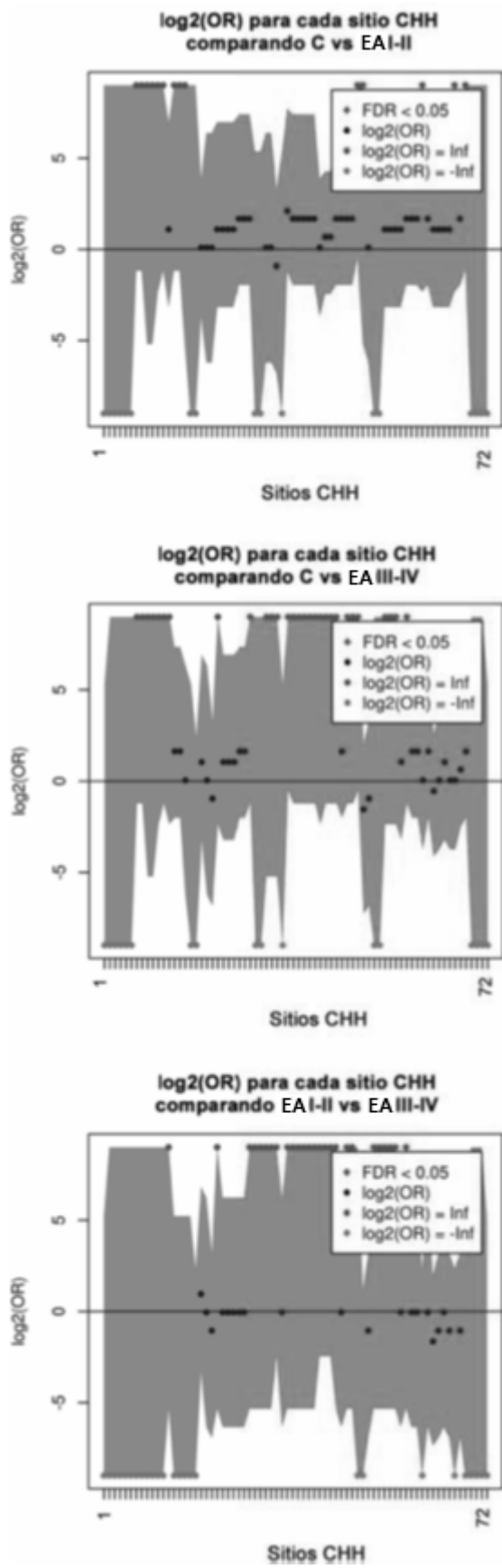


Figura 2 (cont.)

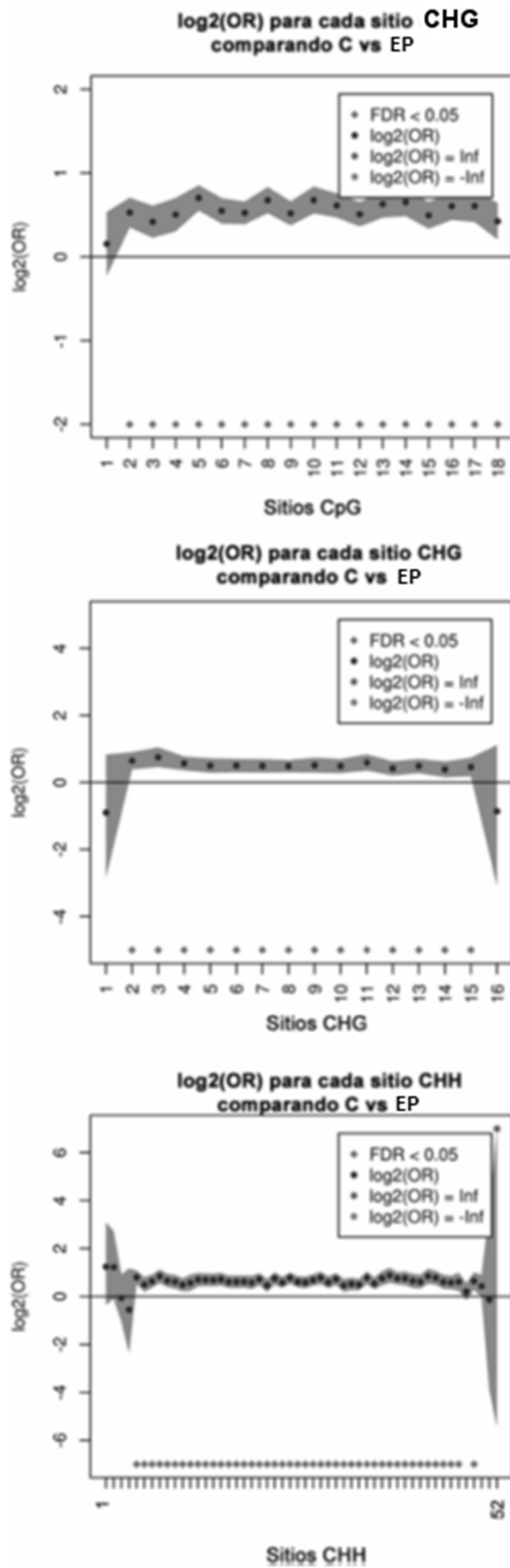
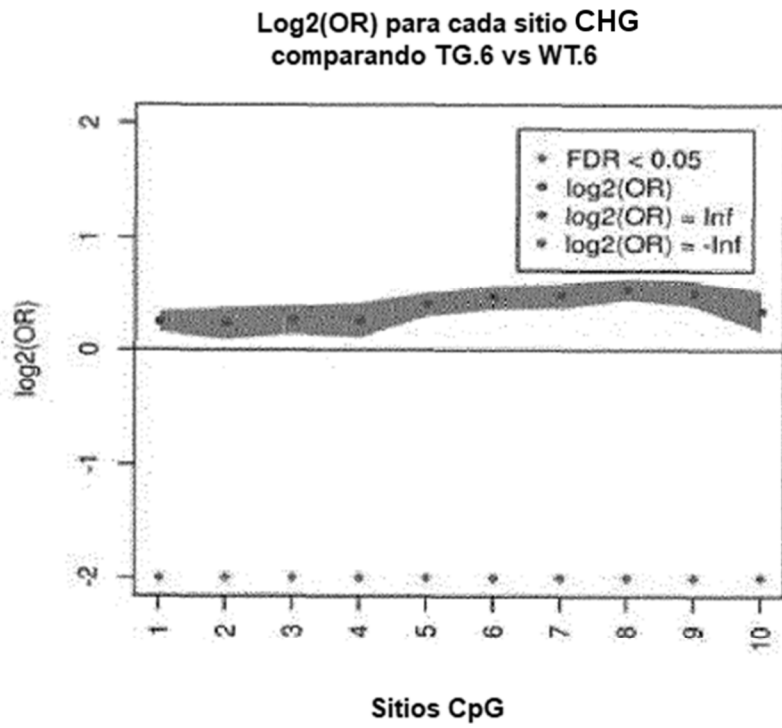


Figura 3

A)



B)

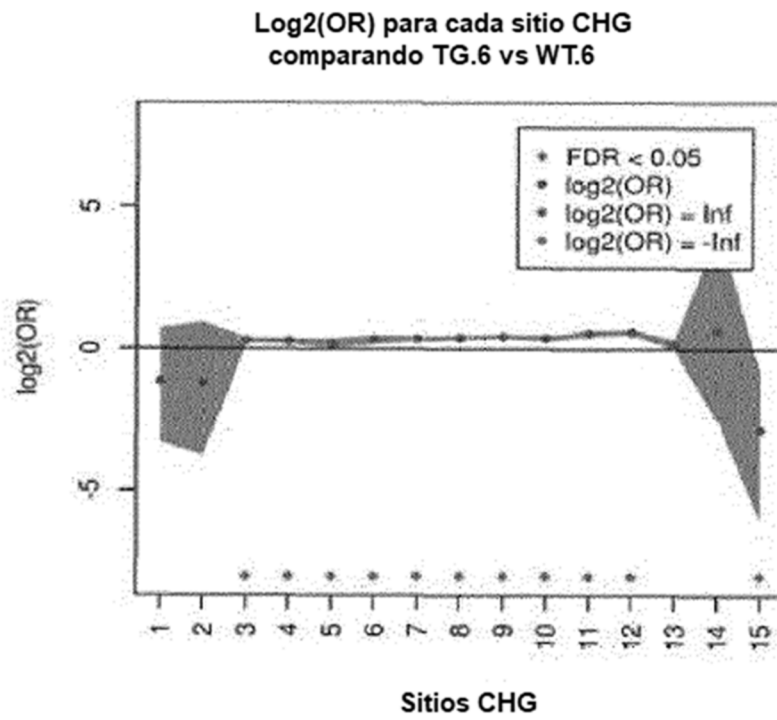


Figura 4

A)

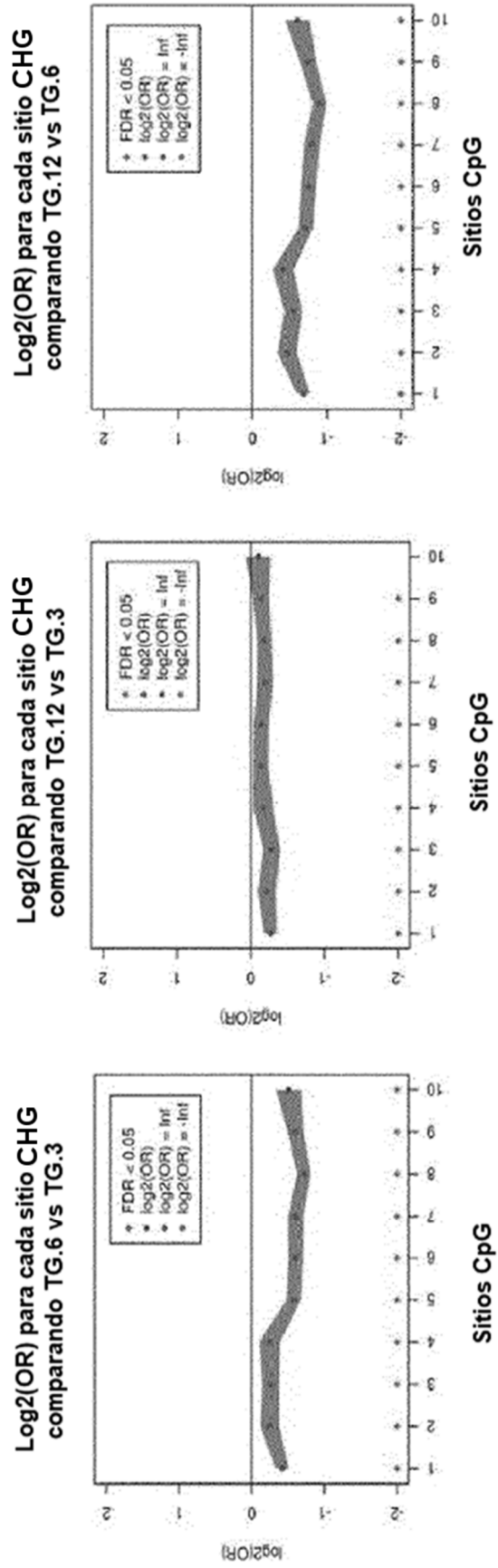


Figura 5

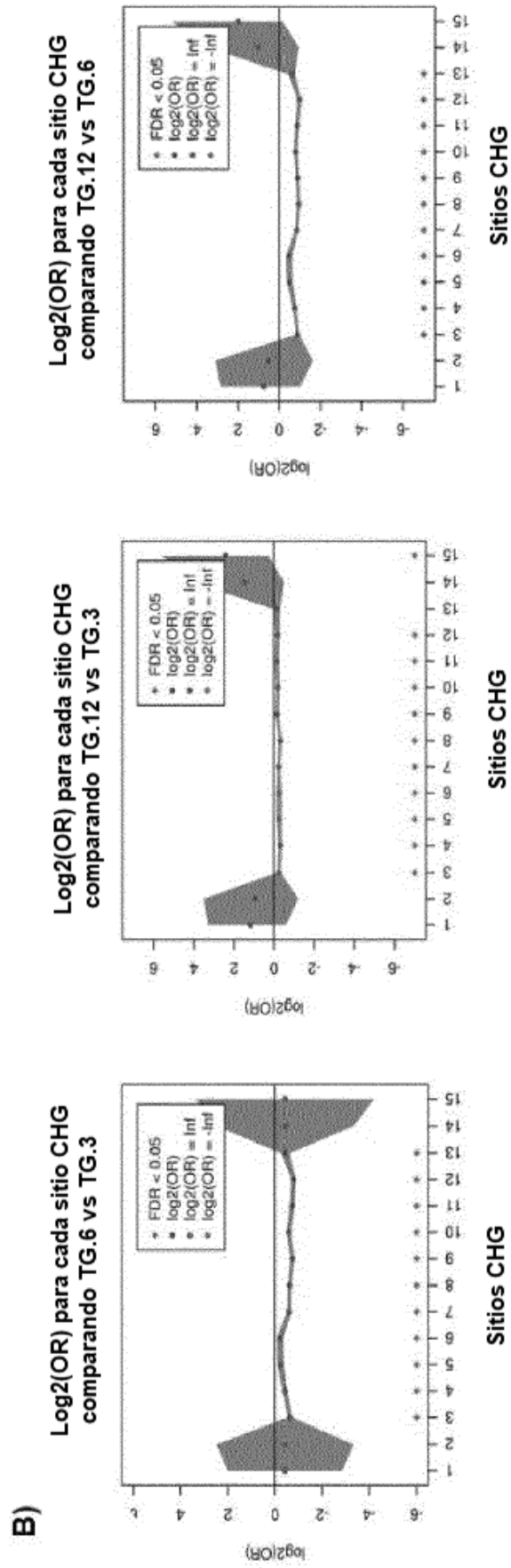
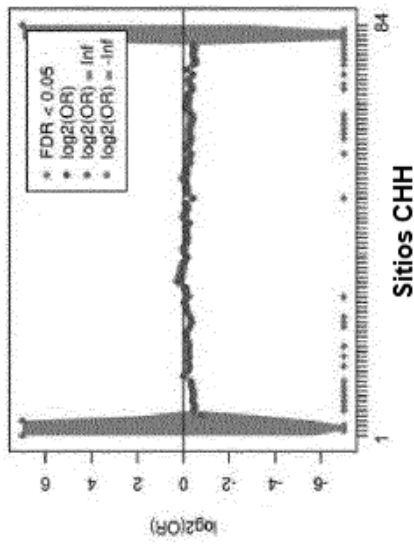


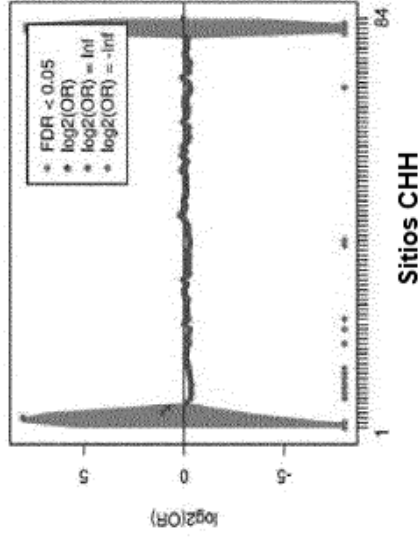
Figura 5 (cont)

C)

Log2(OR) para cada sitio CHH  
comparando TG.6 vs TG.3



Log2(OR) para cada sitio CHH  
comparando TG.12 vs TG.3



Log2(OR) para cada sitio CHH  
comparando TG.12 vs TG.6

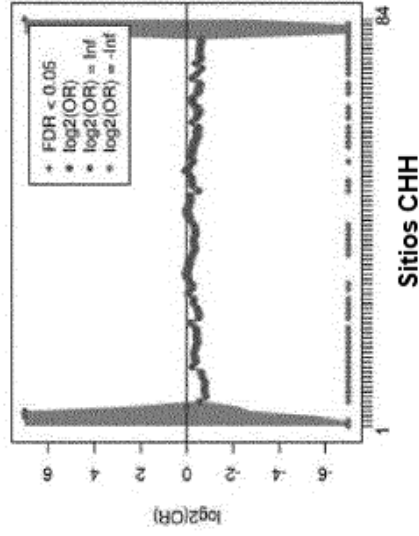


Figura 5 (cont)