

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 699**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

**C40B 40/06** (2006.01)

**C40B 30/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2014 PCT/US2014/065959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15073972**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2014 E 14862355 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3071712**

54 Título: **Métodos de uso de miARN de fluidos corporales para la detección y monitoreo de la enfermedad de Parkinson (PD)**

30 Prioridad:

**18.11.2013 US 201361905703 P**

**04.02.2014 US 201461935806 P**

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

**24.03.2021**

73 Titular/es:

**DIAMIR, LLC (100.0%)  
3 Orchid Court  
Princeton, NJ 08540, US**

72 Inventor/es:

**UMANSKY, SAMUIL R.;  
SHEINERMAN, KIRA S. y  
TSIVINSKY, VLADIMIR G.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 813 699 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de uso de miARN de fluidos corporales para la detección y monitoreo de la enfermedad de Parkinson (PD)

## 5 Campo técnico de la invención

La presente invención está dirigida a métodos para el diagnóstico temprano, la progresión y el seguimiento del tratamiento de la enfermedad de Parkinson (PD) y su diferenciación de otras enfermedades neurodegenerativas mediante la cuantificación de miARN enriquecidos en cerebro en los fluidos corporales.

10

## Antecedentes de la invención

La enfermedad de Parkinson (PD) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común. Aproximadamente 60 000 americanos se diagnostican con la enfermedad de Parkinson cada año, y se estima que entre 0,5 y 7-10 millones de personas en EE.UU. y en todo el mundo, respectivamente, viven con la enfermedad de Parkinson (<http://www.parkinson.org/parkinson-s-disease.aspx>; [http://www.pdf.org/en/parkinson\\_statistics](http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics)).

15

Se estima que el impacto económico anual de la enfermedad de Parkinson en los Estados Unidos es de alrededor de \$10,8 mil millones y sigue creciendo (<http://www.parkinsoninfo.org/about-parkinsons-disease/economic-impact/>).

20

El costo combinado directo e indirecto de la enfermedad de Parkinson, que incluye el tratamiento, los pagos de seguridad social y la pérdida de ingresos por incapacidad para trabajar, se estima en casi \$25 mil millones por año solo en sólo los Estados Unidos ([http://www.pdf.org/en/parkinson\\_statistics](http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics)).

25

Los mecanismos de desarrollo de la PD no se comprenden bien, aunque se han descrito muchos procesos subyacentes (Walter y Schulz-Schaeffer. *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 131-143; David Sulzer. *Trends in Neurosciences.* 2007; 30: 244-250). La enfermedad de Parkinson se inicia por trastornos metabólicos, que incluye el procesamiento anómalo de la alfa-sinucleína, que se agrega y forma los llamados cuerpos de Levy, seguidos de disfunción de la sinapsis, destrucción y finalmente muerte neuronal (Kazantsev AG, Kolchinsky AM. *Arch Neurol.* 2008; 65:1577-1581). Las neuronas de la sustancia negra en el mesencéfalo sufren al máximo en la PD (Walter y Schulz-Schaeffer. *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 131-143) pero otras áreas del cerebro, tal como la corteza frontal (Braak y otros, *Neurobiology of Aging.* 2003; 24: 197-211; Hou y otros, *J. Clin. Neuroscience.* 2010; 17: 628-633), también están involucradas en la patología en diferentes etapas del desarrollo de la PD. La sustancia negra en el mesencéfalo produce dopamina, que transmite señales al cuerpo estriado involucrado en la regulación del movimiento y una disminución significativa en la producción de dopamina causa numerosos trastornos del movimiento característicos de la PD. Estos últimos (temblor, inestabilidad postural y marcha parkinsoniana, rigidez, inexpressividad facial y bradicinesia) son actualmente los principales síntomas usados para el diagnóstico de la PD (Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management. Editores: Factor and Weiner, 2da edición. 2008, Demos Medical Publishing, LLC, Nueva York, NY). Hay otros síntomas, que son desarrollados por algunos pacientes con PD, tal como problemas cognitivos, que pueden conducir a demencia de PD, depresión, problemas de la piel, disfunción olfativa y otros (Aarsland y otros, *Mov. Disord.* 2005; 20: 1255-1263 ; Song y otros, *Eur. Neurol.* 2008; 59: 49-55; Mollenhauer y otros, *Neurology.* 2013; 81: 1226-1234). Algunos datos indican la participación de procesos inflamatorios en el desarrollo de la PD (Tansey y Goldberg. *Neurobiol. Dis.* 2010; 37: 510-518; Amor y otros, *Immunology.* 16 de diciembre de 2013 [Publicación electrónica antes de impresión]).

30

35

40

45

Actualmente, no existe una cura efectiva para la PD, aunque la medicación y la cirugía pueden mejorar algunos síntomas de la PD (Gazewood y otros, *Am. Fam. Physician.* 2013; 87: 267-273). Por ejemplo, los fármacos de sustitución de la dopamina tal como L- DOPA y su combinación con inhibidores de la dopa descarboxilasa se usan ampliamente. Los agonistas del receptor de dopamina, los inhibidores de la monoaminoxidasa y la catecol o-metiltransferasa son otras clases de fármacos usados para tratar la PD (Kansara y otros, *J. Neural Transm.* 2013; 120: 197-210). Los cambios en el estilo de vida y la fisioterapia ayudan a enlentecer la progresión de la PD.

50

Como ocurre con otras enfermedades neurodegenerativas, un período asintomático prolongado es característico de la PD y, en el momento de la manifestación clínica de la PD, el 60-80 % de las neuronas productoras de dopamina están muertas. Por lo tanto, los biomarcadores para la detección temprana de la PD son muy necesarios para el desarrollo de fármacos anti-PD, los ensayos clínicos, el tratamiento oportuno de enfermedades y el seguimiento de enfermedades y tratamientos (Lang. *Neurology.* 2009; 72 (Suppl. 7): S39-43; Jann MW. *Am. J. Manag. Care.* 2011; 17 Suppl 12:S315-21; Sharma y otros, *Neurochem Int.* 2013; 63:201-229). Como ocurre con la AD, las tecnologías de imagen (de la Fuente-Fernandez y otros, *Expert Opin. Med. Diagn.* 2011; 5:109-120; Huddleston y otros, *Clin. Med. Res.* 2013; 11:141) y análisis de proteínas en el líquido cefalorraquídeo (Pametti y otros, *Nat. Rev. Neurol.* 2013; 9:131-140) demuestran resultados prometedores, pero debido a la invasividad y el alto costo, estas técnicas no pueden usarse para la detección primaria. Datos sobre el análisis de  $\alpha$ -sinucleína en plasma sanguíneo (Foulds y otros, *Sci. Rep.* 2013; 3:2540) y otros enfoques (Sharma y otros, *Neurochem Int.* 2013; 63:201-229) parecen prometedores pero necesitan estudios de validación adicionales. Otro tema con implicaciones clínicas significativas es la diferenciación de la PD de otras enfermedades y síndromes neurodegenerativos, tal como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (AD) y el Deterioro Cognitivo Leve (MCI) (Pahwa y Lyons. *Am. J. Manag. Care.* 2010; 16 Suppl. Implications: S94-99).

60

65

Recientemente, los presentes inventores han propuesto un nuevo enfoque para la detección temprana de enfermedades neurodegenerativas basado en el análisis de miARN circulante libre de células en fluidos corporales (Sheinerman y otros, *Aging* (Albany NY). 2012; 4: 590-605; Sheinerman y Umansky. *Cell Cycle*. 2013; 12: 1-2; Sheinerman y Umansky. *Front Cell Neurosci*. 2013; 7: 150; Sheinerman y otros, *Aging* (Albany NY). 2012; 5: 925-938; Publicación de Patente Internacional núms. WO2012/145363 y WO2011/057003).

Los microARN (miARN) son una clase de ARN no codificantes cuyo producto final es una molécula de ARN funcional de aproximadamente 22 nt. Desempeñan papeles importantes en la regulación de genes diana al unirse a regiones complementarias de transcritos mensajeros para reprimir su traducción o regular la degradación (Griffiths-Jones *Nucleic Acids Research*. 2006; 34, número de la base de datos: D140-D144). Con frecuencia, un miARN puede dirigirse a múltiples ARNm y un ARNm puede ser regulado por múltiples miARN dirigidos a diferentes regiones de la 3' UTR. Una vez unido a un ARNm, el miARN puede modular la expresión génica y la producción de proteínas al afectar, por ejemplo, la traducción y estabilidad del ARNm (Baek y otros, *Nature*. 2008; 455:64; Selbach y otros, *Nature*. 2008; 455:58; Ambros. *Nature*. 2004; 431: 350-355; Bartel. *Cell*. 2004; 116: 281-297; Cullen. *Virus Research*. 2004; 102: 3-9; He y otros, *Nat. Rev. Genet*. 2004; 5: 522-531; y Ying y otros, *Gene*. 2004; 342: 25-28). Hay otras clases de ARN pequeños menos caracterizados (revisado en Kim. *Mol. Cells*. 2005; 19: 1-15).

Muchos de los miARN son específicos o sobreexpresados en ciertos órganos/tejidos/células (ver, por ejemplo, Hua y otros, *BMC Genomics*. 2009; 10: 214; Liang y otros, *BMC Genomics*. 2007; 8:166; Landgraf y otros *Cell*. 2007; 129: 1401-1414; Lee y otros, *RNA*. 2008; 14: 35-42) y en diferentes áreas del cerebro, tales como hipocampo, mesencéfalo, corteza frontal, glándula pituitaria y en diferentes tipos de células, tales como neuronas y células gliales (Sempere y otros, *Genome Biol*. 2004; 5: R13; Deo y otros, *Dev. Din*. 2006; 235:2538-2548; Bak y otros, *RNA*. 2008; 14: 432-444; Trivedi y Ramakrishna *Int.J.Neurosci*. 2009; 119: 1995-2016; Weng y otros, *Biomed. Res*. 2011; 32: 135-141; He y otros, *Neuron*. 2012; 73: 35-48).

Algunos miARN, que incluyen los que son específicos de células, están enriquecidos en ciertos compartimentos celulares, particularmente en axones, dendritas y sinapsis (ver, por ejemplo, Schrott y otros, *Nature*. 2006; 439:283-289; Lugli y otros, *J. Neurochem*. 2008; 106:650-661; Bicker y Schrott. *J. Cell. Mol. Med*. 2008; 12:1466-1476; Smalheiser y Lugli. *Neuromolecular Med*. 2009; 11:133-140; Rajasethupathy. *Neuron*. 2009; 63:714-716; Kye. *RNA*. 2007; 13:1224-1234; Yu y otros, *Exp Cell Res*. 2008; 314:2618-2633; Cougot y otros, *J. Neurosci*. 2008; 28:13793-13804; Kawahara. *Brain Nerve*. 2008. 60:1437-1444; Schrott G. *Rev Neurosci*. 2009; 10:842-849; Pichardo-Casas y otros, *Brain Research*. 2012; 1436:20-33).

La expresión y las concentraciones de miARN están reguladas por diversas señales fisiológicas y patológicas. Se encontraron cambios en la expresión de algunos miARN en neuronas de pacientes con enfermedad de Parkinson, Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Hebert y De Strooper. *Trends Neurosci*. 2009; 32:199-206; Saba y otros, *PLoS One*. 2008; 3:e3652; Kocerha y otros, *Neuromolecular Med*. 2009; 11:162-172; Sethi y Lukiw. *Neurosci Lett*. 2009; 459:100-104; Zeng; *Mol Pharmacol*. 2009; 75:259-264; Cogswell y otros, *Journal of Alzheimer's disease*. 2008; 14: 27-41; Schaefer y otros, *J. Exp. Med*. 2007; 204:1553-1558; Hebert. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU* 2008; 105:6415-6420; Wangy otros *J. Neurosci*. 2008; 28:1213-1223; Nelson y otros, *Brain Pathol*. 2008; 18:130-138; Lukiw. *Neuroreport*. 2007; 18:297-300).

Las investigaciones de la participación de miARN en la enfermedad de Parkinson (PD) se han centrado en el análisis de la expresión de miARN en el mesencéfalo y del papel de miARN en el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas y la síntesis de  $\alpha$ -sinucleína. La regulación a la baja de miR-133b en el mesencéfalo de pacientes con PD (Kim y otros *Science*. 2007; 317: 1220-1224) así como también en modelos de ratón de PD se ha informado en varios estudios (revisiones: Filatova y otros, *Biochemistry (Mosc)*. 2012; 77: 813-819; Harraz y otros, *J. Chem. Neuroanat*. 2011; 42: 127-130; Mouradian. *Neurobiol Dis*. 2012; 46: 279-284). Se ha encontrado que miR-7 y miR-153 regulan a la baja la síntesis de  $\alpha$ -sinucleína (Doxakis. *J. Biol. Chem*. 2010; 285: 12726-12734; Junn y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU* 2009; 106: 13052-13057). Debido a su pequeño tamaño, los miARN pueden atravesar las barreras hematoencefálica, placentaria y renal. Se propuso el análisis de miARN específicos de células/tejidos en fluidos corporales para la detección de muerte celular in vivo (publicación de patente de EE.UU. núm. 20090081640; Laterza y otros, *Clin. Chem*. 2009; 55:1977-1983).

Para el uso de miARN en el diagnóstico, también es importante que la secreción de miARN varíe en dependencia de la fisiología celular (Palma y otros, *Nucleic Acids Res*. 2012; 40: 9125-9138; Pigati y otros, *PLoS One*. 2010; 5: e13515). Además de la liberación de miARN en el espacio extracelular y su subsecuente aparición en los fluidos corporales debido a la muerte celular, los miARN aparecen en circulación debido a la formación de vesículas en los cuerpos apoptóticos, la gemación y desprendimiento de microvesículas, la secreción activa en forma de exosomas y de complejos de miARN con proteínas. (AGO2, NPM1 y otras) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) (revisiones: Sun y otros, *Clin. Chem. Lab. Med*. 2012; 50: 2121-2126; Zandberga y otros, *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52: 356-369). Todas estas formas de miARN libres de células son muy estables en el torrente sanguíneo y otros fluidos corporales. La secreción de miARN es selectiva y puede modificarse significativamente por diversos procesos patológicos. Por ejemplo, se han demostrado cambios en el espectro de miARN secretado en exosomas de células neuronales infectadas con priones, en comparación con células no infectadas (Bellingham y otros, *Nucleic Acids Res*.

2012; 40: 10937-10949).

Se usan ampliamente dos enfoques para buscar biomarcadores de miARN de diversas enfermedades en los fluidos corporales:

1. Medición de cientos de miARN diferentes en un fluido corporal de pacientes con una patología de interés y de sujetos de control mediante el uso de una matriz de miARN o secuenciación de nueva generación (NGS) (Qin y otros, *Cancer Inform.* 2013; 12: 83-101). Si bien este enfoque permite analizar una gran cantidad de varios miARN, actualmente las técnicas de secuenciación y basadas en matrices de miARN no son lo suficientemente sensibles para detectar muchos miARN cuya concentración en los fluidos corporales es relativamente baja. Como consecuencia, la mayoría de los miARN detectables en los fluidos corporales mediante matrices y NGS son miARN ubicuos expresados en todos o en muchos tejidos, y muchos de ellos derivan de células sanguíneas (Pritchard y otros, *Cancer Prev. Res. (Phila.)* 2012; 5: 492-497; Leidner y Thompson. *PLoS One.* 2013; 8: 57841). La detección de cambios en las concentraciones de tal miARN ubicuo en pacientes con una patología no significa que el mismo miARN no pueda estar involucrado en otras enfermedades de diferentes órganos. Muchos miARN se asocian con un tipo de patología particular, tal como cáncer, inflamación, hipoxia, etc., y los cambios en su concentración en los fluidos corporales pueden asociarse con enfermedades de diferentes órganos. Por ejemplo, se encontraron cambios en las concentraciones de miR-155 en el torrente sanguíneo de pacientes con cánceres de mama, esófago, pulmón, páncreas y linfomas (Blair y Yan. *DNA Cell Biol.* 2012; 31 Suppl. 1: S49-61; Xie y otros, *Bioinformatics.* 2013; 29: 638-644). El nivel de miR-21 aumenta en el plasma/suero de pacientes con osteosarcoma, cánceres de vejiga, esófago, gástrico, pulmón, mama, colorrectal, carcinoma de células escamosas de cuello y otros tumores (Blair y Yan. *DNA Cell Biol.* 2012; 31 Supl. 1: S49-61; Farazi y otros, *J. Pathol.* 2011; 223: 102-115; Xie y otros, *Bioinformatics.* 2013; 29: 638-644). De ello se deduce que los biomarcadores potenciales encontrados por las matrices de miARN también deben probarse en otras patologías, no solo en sujetos de control sanos.

2. El segundo enfoque se basa en el análisis de miARN específicos de la enfermedad identificados mediante la comparación de miARN aislados de tejido, órgano o tipo celular patológico y normal. Aquí, después de la identificación de miARN específicos de la enfermedad (por ejemplo, mediante una matriz seguido por RT-PCR), se analiza su presencia en los fluidos corporales. En esta estrategia, dado que se prueba un número limitado de miARN circulantes, es posible el uso de RT-PCR individual lo que permite aumentar la sensibilidad y reproducibilidad del análisis. Sin embargo, en muchos casos cuando se aplicó este método, no se detectó correlación entre la concentración de miARN y los cambios inducidos por patología en el tejido y en los fluidos corporales (Boeri y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU* 2011; 108: 3713-3718; Cuk y otros, *Int. J. Cancer.* 2013; 132: 1602-1612).

#### Resumen de la Invención

Como se describió anteriormente, en la sección de Antecedentes, a pesar de los avances recientes, existe una gran necesidad en la técnica de métodos sensibles de detección temprana de enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson (PD). La presente invención aborda esta y otras necesidades al proporcionar métodos para el diagnóstico temprano, la progresión y el seguimiento del tratamiento de la PD y su diferenciación de otras enfermedades neurodegenerativas mediante la cuantificación de miARN enriquecidos en cerebro en los fluidos corporales.

La invención se define por las reivindicaciones.

De manera más general, se describe en la presente descripción un método para detectar una primera enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa;

b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no se ve afectada por la primera enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la primera enfermedad neurodegenerativa;

c) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (a) y (b);

d) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e

e) (i) identificar al sujeto como afectado por la primera enfermedad neurodegenerativa cuando la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al

sujeto como no afectado por la primera enfermedad neurodegenerativa cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la relación de control correspondiente.

5 En un aspecto relacionado, se describe en la presente descripción un método para detectar una primera enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, cuyo método comprende:

10 a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa o (ii) es un miARN asociado a inflamación;

10 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN (i) es un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o (ii) es un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

15 c) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (a) y (b);

d) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e

20 (e) (i) identificar al sujeto como afectado por la primera enfermedad neurodegenerativa cuando la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la primera enfermedad neurodegenerativa cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la relación de control correspondiente.

25 En una modalidad de los dos métodos anteriores, el método comprende además refinar el diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y/o con las etapas (d)-(e) de los dos métodos anteriores:

30 f) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c) con el intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de una segunda enfermedad neurodegenerativa, y

35 g) (i) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) no cae dentro del intervalo estándar de las relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) no excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.

40 En una modalidad de los dos métodos anteriores, el método comprende además refinar el diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y/o con las etapas (a)-(e) de los dos métodos anteriores:

45 f) medir el nivel de un tercer miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho tercer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por una segunda enfermedad neurodegenerativa;

50 g) medir el nivel de un cuarto miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho cuarto miARN enriquecido en el cerebro está (i) enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectada por la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el tercer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del tercer miARN durante el desarrollo de la segunda enfermedad neurodegenerativa;

h) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (f) y (g);

55 i) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (h) con el intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de una segunda enfermedad neurodegenerativa;

60 (j) (i) identificar al sujeto como afectado por la segunda enfermedad neurodegenerativa además de la primera enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) no cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.

65 De acuerdo con la invención, dicha primera enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson (PD).

En una modalidad de los métodos anteriores de diferenciación de enfermedades anteriores, dicha primera enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson (PD) y dicha segunda enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (AD), Deterioro Cognitivo Leve (MCI), enfermedad de Huntington (HD), enfermedades causadas por priones, demencia frontotemporal (FTD), demencia con cuerpos de Lewy, demencias vasculares, Esclerosis Tardía Amiotrófica (ALS), encefalopatía traumática crónica (CTE), parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (MSA), degeneración corticobasal (CB-GD), enfermedad de Pick y atrofia olivopontocerebelosa (OPCA).

En un aspecto, se describe un método para detectar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto, cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro es miARN neuronal enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal;

b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro está (i) enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la PD, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la PD, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambian de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la PD;

c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

d) comparar la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e

(e) (i) identificar al sujeto como afectado por la PD cuando la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la PD cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es más alta que la relación de control correspondiente.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para detectar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto, cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN es (i) un miARN neuronal enriquecido en el cerebro enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal o es (ii) un miARN asociado a inflamación;

b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN es (i) un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o es (ii) un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

d) comparar la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e

e) (i) identificar al sujeto como afectado por la PD cuando la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la PD cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es más alta que la relación de control correspondiente.

En una modalidad de los dos métodos anteriores para detectar la PD, el método comprende además refinar el diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y con las etapas (d)-(e) de los dos métodos anteriores para detectar la PD:

f) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) con el intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de una segunda enfermedad neurodegenerativa diferente de la PD;

g) (i) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) no cae dentro del intervalo estándar de las relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) no excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.

En una modalidad de los dos métodos anteriores para detectar la PD, el método comprende además refinar el

diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y con las etapas (a)-(e) de los dos métodos anteriores para detectar la PD:

- 5 f) medir el nivel de un tercer miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho tercer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por una segunda enfermedad neurodegenerativa y es un numerador preidentificado en un par de miARN de biomarcador para dicha segunda enfermedad neurodegenerativa;
- 10 g) medir el nivel de un cuarto miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho cuarto miARN enriquecido en el cerebro es y es un denominador preidentificado en el par de miARN biomarcador para dicha segunda enfermedad neurodegenerativa y está (i) enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no se ve afectada(s) por la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no se ve afectada por la segunda enfermedad neurodegenerativa y es diferente del tipo de célula donde se encuentra el tercer miARN enriquecido, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el
- 15 tercer miARN, pero su expresión y/o secreción cambian de manera diferente a la expresión y/o secreción del tercer miARN durante el desarrollo de la segunda enfermedad neurodegenerativa;
- h) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (f) y (g);
- 20 i) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) con el intervalo estándar de relaciones de dichos iARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa;
- 25 j) (i) identificar al sujeto como afectado por la segunda enfermedad neurodegenerativa además de la PD si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) no cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.
- 30 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de detección de enfermedades, la relación de control es un valor predeterminado que representa una relación umbral validada estadísticamente de los niveles de dicho primer y segundo miARN (un único valor de "corte") igual al valor más alto posible dentro del intervalo de valores correspondientes en sujetos sanos de la misma edad. En otra modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de detección de enfermedades, la relación de control es la relación de los niveles de dicho primer y segundo miARN en
- 35 una muestra de fluido corporal procesada de manera similar a la del mismo sujeto recolectada en el pasado.
- En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de diferenciación de la enfermedad, el intervalo estándar de relaciones de miARN característico de la segunda enfermedad neurodegenerativa es un intervalo predeterminado validado estadísticamente de valores establecidos al determinar las relaciones de los mismos miARN en una gran
- 40 cohorte de sujetos diagnosticados con la segunda enfermedad neurodegenerativa. En una modalidad específica, la cohorte de sujetos diagnosticados con la segunda enfermedad neurodegenerativa representa un intervalo completo de etapas de desarrollo de dicha segunda enfermedad neurodegenerativa. En otra modalidad específica, la cohorte de sujetos diagnosticados con la segunda enfermedad neurodegenerativa representa una o más etapas de desarrollo de dicha segunda enfermedad neurodegenerativa.
- 45 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de diferenciación de enfermedades, dicha segunda enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (AD), deterioro cognitivo leve (MCI), enfermedad de Huntington (HD), enfermedades causadas por priones, demencia frontotemporal (FTD), demencia con cuerpos de Lewy, demencias vasculares, Esclerosis Tardía Amiotrófica (ALS), encefalopatía traumática crónica (CTE), parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia múltiple sistémica (MSA), degeneración corticobasal (CB-GD), enfermedad de Pick y atrofia olivopontocerebelosa (OPCA).
- 50 En otro aspecto, se describe un método para monitorear los cambios en el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que había sido diagnosticado previamente con dicha enfermedad neurodegenerativa), cuyo método comprende:
- 55 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en dos o más muestras de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa;
- 60 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en las mismas muestras de fluidos corporales que en la etapa (a), en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectada por la enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa;
- 65

- c) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (a) y (b) para cada muestra de fluido corporal;
- 5 d) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (c) entre la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) anteriormente y las recolectadas posteriormente, y
- 10 (e) (i) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) aumenta en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente, o (ii) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto no ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no cambia en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente.
- 15 En un aspecto relacionado, se describe un método para monitorear cambios en el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que había sido diagnosticado previamente con dicha enfermedad neurodegenerativa), cuyo método comprende:
- 20 a) medir el nivel de un primer miARN en dos o más muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto, en donde dicho primer miARN (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa o (ii) es un miARN asociado a inflamación;
- 25 b) medir el nivel de un segundo miARN en las mismas muestras de fluidos corporales que en la etapa (a), en donde dicho segundo miARN (i) es un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o (ii) es un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;
- 30 c) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (a) y (b) para cada muestra de fluido corporal;
- 35 d) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (c) entre la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) anteriormente y las recolectadas posteriormente, y
- 40 e) (i) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) aumenta en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente, o (ii) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto no ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no cambia en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente.
- 45 En un aspecto relacionado, se describe un método para monitorear cambios en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que había sido diagnosticado previamente con PD), cuyo método comprende:
- 50 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en dos o más muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto, en donde las muestras se han recolectado en puntos de tiempo espaciados, y en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en el mesencéfalo y/o frontal corteza;
- 55 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en las mismas muestras de fluido corporal que en la etapa (a), en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro está (i) enriquecido en áreas del cerebro que no están afectadas por la PD, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la PD, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN enriquecido en el cerebro, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN enriquecido en el cerebro durante el desarrollo de la PD;
- 60 c) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (a) y (b) para cada muestra de fluido corporal;
- 65 d) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (c) entre la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) anteriormente y las recolectadas posteriormente, y
- e) (i) determinar que la PD en el sujeto ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) aumenta en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente, o (ii) determinar que la PD en el sujeto no ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no cambia en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente.



En otro aspecto relacionado, se describe un método para monitorear cambios en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que había sido diagnosticado previamente con PD), cuyo método comprende:

- 5 a) medir el nivel de un primer miARN en dos o más muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto, en donde las muestras se han recolectado en puntos de tiempo espaciados, y en donde dicho primer miARN es (i) un miARN neuronal enriquecido en el cerebro enriquecido en el mesencéfalo y/o corteza frontal o es (ii) un miARN asociado a inflamación;
- 10 b) medir el nivel de un segundo miARN en las mismas muestras de fluido corporal que en la etapa (a), en donde dicho segundo miARN es (i) un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o es (ii) un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;
- 15 c) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (a) y (b) para cada muestra de fluido corporal;
- d) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (c) entre la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) anteriormente y las recolectadas posteriormente, y
- 20 e) (i) determinar que la PD en el sujeto ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) aumenta en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente, o (ii) determinar que la PD en el sujeto no ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no cambia en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente.

25 En un aspecto separado, se describe un método para monitorear el efecto de un tratamiento sobre el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto al que previamente se le había diagnosticado dicha enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende:

- 30 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto antes del inicio del tratamiento, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa;
- 35 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa;
- 40 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestra(s) de fluido corporal recolectadas del
- 45 sujeto en el curso de o después del tratamiento;
- e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- 50 f) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada muestra de fluido corporal;
- g) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en las etapas (c) y (f) y, opcionalmente, comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (f) entre diferentes muestras en la etapa (d), y
- 55 h) (i) determinar que el tratamiento es efectivo para dicha enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f), o (ii) determinar que el tratamiento no es efectivo para dicha enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f).
- 60

65 En un aspecto relacionado, se describe un método para monitorear el efecto de un tratamiento sobre el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto al que previamente se le había diagnosticado dicha enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende:

- a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto antes del inicio del tratamiento, en donde dicho primer miARN (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa o (ii) es un miARN asociado a inflamación;
- 5 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN (i) es un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o (ii) es un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;
- 10 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) del sujeto en el curso de o después del tratamiento;
- 15 e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- f) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada muestra de fluido corporal;
- 20 g) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en las etapas (c) y (f) y, opcionalmente, comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (f) entre diferentes muestras en la etapa (d), y
- 25 h) (i) determinar que el tratamiento es efectivo para dicha enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f), o (ii) determinar que el tratamiento no es efectivo para dicha enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f).
- 30 En otro aspecto relacionado, se describe un método para monitorear el efecto de un tratamiento sobre el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto que había sido previamente diagnosticado con PD, cuyo método comprende:
- 35 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto antes del inicio del tratamiento, en donde dicho primer miARN está enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal;
- 40 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN está (i) enriquecido en áreas del cerebro que no están afectadas por la PD, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la PD, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la PD;
- 45 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) del sujeto en el curso de o después del tratamiento;
- 50 e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- f) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada muestra de fluido corporal;
- 55 g) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en las etapas (c) y (f) y, opcionalmente, comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (f) entre diferentes muestras en la etapa (d), y
- 60 h) (i) determinar que el tratamiento para la PD es efectivo si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f), o (ii) determinar que el tratamiento para la PD no es efectivo si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f).

65 En aún aspecto relacionado, se describe un método para monitorear el efecto de un tratamiento sobre el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto que había sido previamente diagnosticado con PD, cuyo método comprende:

- a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto antes del inicio del

tratamiento, en donde dicho primer miARN es (i) un miARN neuronal enriquecido en el cerebro enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal o es (ii) un miARN asociado a inflamación;

5 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN es (i) un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o es (ii) un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

10 d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) del sujeto en el curso de o después del tratamiento;

e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);

15 f) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada muestra de fluido corporal;

g) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en las etapas (c) y (f) y, opcionalmente, comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (f) entre diferentes muestras en la etapa (d), y

h) (i) determinar que el tratamiento para la PD es efectivo si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f), o (ii) determinar que el tratamiento para la PD no es efectivo si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f).

25 En un aspecto separado, se describe un método para identificar un compuesto útil para enlentecer la progresión o tratar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto al que previamente se le había diagnosticado dicha enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende:

30 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal, en donde dicha(s) muestra(s) de fluido corporal se recolecta(n) del sujeto antes de la administración del compuesto de prueba, y en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa;

35 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa;

40 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

45 d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestras de fluido corporal recolectada(s) del sujeto después de la administración de un compuesto de prueba;

e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);

50 f) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto después de la administración del compuesto de prueba;

55 g) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en las etapas (c) y (f), y

h) (i) identificar que el compuesto de prueba es útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (f) es menor que la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto de prueba no es útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (f) no es menor que la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c).

60 En un aspecto relacionado, se describe un método para identificar un compuesto útil para enlentecer la progresión o tratar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto al que previamente se le había diagnosticado dicha enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende:

65 a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal, en donde dicha(s) muestra(s) de fluido

corporal se recolecta(n) del sujeto antes de la administración del compuesto de prueba, y en donde dicho primer miARN (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa o (ii) es un miARN asociado a inflamación;

5 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN (i) es un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o (ii) es un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

10 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestras de fluido corporal recolectada(s) del sujeto después de la administración de un compuesto de prueba;

15 e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);

f) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto después de la administración del compuesto de prueba;

20 g) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en las etapas (c) y (f), y

h) (i) identificar que el compuesto de prueba es útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (f) es menor que la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto de prueba no es útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (f) no es menor que la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c).

30 En otro aspecto relacionado, se describe un método para identificar un compuesto útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto que había sido diagnosticado previamente con PD, cuyo método comprende:

35 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal, en donde dicha(s) muestra(s) de fluido corporal se recolecta del sujeto antes de la administración del compuesto de prueba, y en donde dicho primer miARN está enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal;

40 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN está (i) enriquecido en áreas del cerebro que no están afectadas por la PD, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la PD, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la PD;

c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

45 d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestras de fluido corporal recolectada(s) del sujeto después de la administración de un compuesto de prueba;

e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);

50 f) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto después de la administración del compuesto de prueba;

g) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en las etapas (c) y (f), y

55 h) (i) identificar que el compuesto de prueba es útil para enlentecer la progresión o tratar la PD si la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (f) es menor que la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto de prueba no es útil para enlentecer la progresión o tratar la PD si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (f) no es menor que la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c).

60 En aún otro aspecto relacionado, se describe un método para identificar un compuesto útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto que había sido diagnosticado previamente con PD, cuyo método comprende:

65 a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal, en donde dicha(s) muestra(s) de fluido corporal se recolectan del sujeto antes de la administración del compuesto de prueba, y en donde dicho primer miARN

es (i) un miARN neuronal enriquecido en el cerebro enriquecido en el mesencéfalo y/o corteza frontal o es (ii) un miARN asociado a inflamación;

5 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN es (i) un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o es (ii) un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

10 d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestras de fluido corporal recolectada(s) del sujeto después de la administración de un compuesto de prueba;

e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);

15 f) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto después de la administración del compuesto de prueba;

20 g) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en las etapas (c) y (f), y

h) (i) identificar que el compuesto de prueba es útil para enlentecer la progresión o tratar la PD si la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (f) es menor que la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto de prueba no es útil para enlentecer la progresión o tratar la PD si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (f) no es menor que la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c).

En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson (PD).

30 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el primer miARN enriquecido en el cerebro es un miARN neuronal. En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el primer miARN enriquecido en el cerebro es miARN de sinapsis y/o neuritas.

35 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el segundo miARN es un miARN enriquecido en el cerebro, que (1) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que está(n) afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, PD) o (2) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectada por la primera enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, PD). En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el segundo miARN es un miARN enriquecido en el cerebro seleccionado del grupo que consiste en miARN que se expresan principalmente en áreas del cerebro no involucradas en la PD, miARN que se expresan principalmente en células gliales y miARN enriquecidos el cerebro regulados a la baja en la PD.

40 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores que implican el primer y el segundo miARN que están enriquecidos en el cerebro, el primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en neuronas y el segundo miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en células gliales.

45 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores que implican el primer y segundo miARN que están enriquecidos en el cerebro, el par del primer miARN y el segundo miARN se selecciona del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, let-7e/miR-9\*, let-7e/miR-132, let-7e/miR-134, let-7e/miR-323-3p, let-7e/miR-411.

50 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores que implican el primer y segundo miARN, uno de los cuales está enriquecido en el cerebro y otro asociado a inflamación, el par del primer miARN y el segundo miARN se selecciona del grupo que consiste en: let-7e/miR-146b, let-7e/miR-146a,.

55 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de diferenciación de enfermedades que implican el primer y segundo miARN que están enriquecidos en el cerebro, el par del primer miARN y el segundo miARN se selecciona del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, let-7e/miR-9\*, let-7e/miR-132, let-7e/miR-210, let-7e/miR-874, let-7e/miR-134, let-7e/miR-411. En otra modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de diferenciación de enfermedades que implican el primer y segundo miARN que están enriquecidos en el cerebro, el par del primer miARN y el segundo miARN se selecciona del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, let-7e/miR-411, let-7e/miR-9\*, let-7e/miR-132, let-7e/miR-134, let-7e/miR-210, let-7e/miR-874,.

60 En una modalidad de los métodos anteriores de diferenciación de enfermedades que implican el primer y segundo miARN, uno de los cuales está enriquecido en el cerebro y otro asociado a inflamación, el par del primer miARN y el segundo miARN se selecciona del grupo que consiste en: let-7e/miR-146a, let-7e/miR-146b. En otra modalidad de los métodos anteriores de diferenciación de enfermedades que implican el primer y segundo miARN, uno de los cuales está enriquecido en el cerebro y otro asociado a inflamación, el par del primer miARN y el segundo miARN se

65

selecciona del grupo que consiste en: let-7e/miR-146b, let-7e/miR-146a.

En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende medir el nivel y calcular las relaciones de los niveles para dos o más pares diferentes de miARN.

5 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de detección o diferenciación de enfermedades, el método comprende medir los niveles de los miARN en dos o más muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto, en donde las muestras se han recolectado en puntos de tiempo separados.

10 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores que involucran muestras de fluido corporal que se han recolectado en puntos de tiempo espaciados, las muestras de fluido corporal se obtienen con varios meses de diferencia (por ejemplo, con 3-6 meses de diferencia).

15 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende además normalizar los niveles del primer y segundo miARN al nivel de un miARN normalizador. En una modalidad específica, el miARN normalizador es miARN que se expresa en numerosos tejidos pero no se expresa significativamente en el cerebro.

20 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el sujeto es un humano. En otra modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el sujeto es un animal de experimentación (por ejemplo, un modelo animal de una enfermedad neurodegenerativa como, por ejemplo, la PD).

En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en plasma sanguíneo, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (CSF) y saliva.

25 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende la etapa de recolectar la(s) muestra(s) de fluid corporal del sujeto (por ejemplo, antes de la etapa (a)).

En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el nivel de los miARN se determina mediante el uso de un método seleccionado del grupo que consiste en hibridación, RT-PCR y secuenciación.

30 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, antes de medir el nivel de miARN, el miARN se purifica a partir de la muestra de fluido corporal.

35 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, el método comprende además la etapa de reducir o eliminar la degradación de los miARN.

40 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de detección de enfermedades o de monitoreo de enfermedades, el método comprende además administrar un tratamiento terapéutico o preventivo al sujeto que ha sido diagnosticado con la enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, PD) o que tiene riesgo de progresión a una forma más grave de la enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, PD). En el caso de la PD, los ejemplos no limitantes de tratamientos farmacológicos útiles incluyen, por ejemplo, la administración de fármacos que reponen la dopamina o que mimetizan la dopamina tal como, por ejemplo, levodopa o tratamientos combinados con levodopa, que pueden incluir la administración con inhibidores de la dopa descarboxilasa (por ejemplo, carbidopa, benserazida); potenciadores de la dopamina, tales como inhibidores de la catecol o-metiltransferasa (COMT) (por ejemplo, entacapona, tolcapona); agonistas del receptor de dopamina (por ejemplo, ropinirol, pramipexol, rotigotina, apomorfina, pergolida, bromocriptina); inhibidores de la monoaminoxidasa (MAOI), que pueden usarse solos o con levodopa (por ejemplo, selegilina, rasagilina, sal HCl de zydis selegilina); amantadina (usada para combatir el temblor y los efectos secundarios de la administración de levodopa); anticolinérgicos (por ejemplo, trihexifenidilo, bztropina). Otros fármacos potencialmente útiles que se están estudiando actualmente para el tratamiento de la PD son los antiglutamatérgicos (por ejemplo, memantina, safinomida); terapias con neurturina; antiapoptóticos (por ejemplo, omigapil, CEP-1347); promitocondriales (por ejemplo, Coenzima Q<sub>10</sub>, creatina); bloqueadores de los canales de calcio, incluida la isradipina, y factores de crecimiento tal como GDNF; así como también fármacos o vacunas dirigidos a la alfa-sinucleína. Los ejemplos no limitantes de terapias quirúrgicas útiles incluyen, por ejemplo, estimulación cerebral profunda (DBS), que implica la implantación de un electrodo alimentado por batería en el cerebro; operaciones directamente sobre tejido neural (por ejemplo, talamotomía, palidotomía, subtalamotomía); y trasplante de células dopamérgicas. También se puede usar un régimen de dieta y ejercicio físico (por separado o en combinación con otros tratamientos) para aliviar los síntomas de la PD. Ejemplos no limitantes de suplementos alimenticios útiles incluyen, por ejemplo, antioxidantes tales como las vitaminas C y E, calcio, raíz de jengibre, té verde y extractos de té verde, hierba de San Juan, Ginkgo biloba, cardo mariano, vitamina B12 y ácido fólico. Actualmente no está claro si la PD se puede revertir. Un tratamiento efectivo puede significar una mejoría de la PD (disminución de una relación de miARN biomarcador) o la prevención/inhibición de un mayor desarrollo de la PD (la relación de miARN biomarcador permanece igual o aumenta más lentamente).

65 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de detección de enfermedad o de seguimiento de la progresión de la enfermedad, el método comprende además reclutar al sujeto en un ensayo clínico.

Junto con los métodos anteriores descritos en la presente descripción, la descripción también proporciona varios kits.

Los ejemplos no limitantes de los kits descritos en la presente descripción incluyen:

1. Un kit para detectar la PD que comprende cebadores y/o sondas específicos para uno o más pares de miARN seleccionados del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, let-7e/miR-9\*, let-7e/miR-132, let-7e/miR-323-3p, let-7e/miR-411 let-7e/miR-146b, let-7e/miR-146a.
  2. Un kit para diferenciar la PD de MCI que comprende cebadores y/o sondas específicas para uno o más pares de miARN seleccionados del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, let-7e/miR-9\*, let-7e/miR-132, let-7e/miR-210, let-7e/miR-134, let-7e/miR-411, let-7e/miR-146a, let-7e/miR-146b.
  3. Un kit para diferenciar la PD de la AD que comprende cebadores y/o sondas específicas para uno o más pares de miARN seleccionados del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, miR-107/miR-335, let-7e/miR-411, let-7e/miR-9\*, let-7e/miR-132, let-7e/miR-134, let-7e/miR-874, let-7e/miR-146b, let-7e/miR-146a.
- Cualquiera de los kits anteriores puede comprender además medios de aislamiento y/o purificación de miARN y/o instrucciones de uso.

En un aspecto separado, se describe un método para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:

- (a) seleccionar al menos cuatro miARN que se sabe que están enriquecidos en un órgano afectado por la patología;
- (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- (c) calcular el nivel medio de cada miARN medido en la etapa (b);
- (d) calcular la diferencia entre los niveles medios de miARN calculada en la etapa (c);
- (e) comparar las diferencias entre los niveles medios de miARN calculados en la etapa (d) entre todos los miARN estudiados y seleccionar como pares biomarcadores potenciales aquellos pares de miARN para los que la diferencia calculada en la etapa (d) para un miARN es al menos 1,5 veces la diferencia calculada para el otro miARN;
- (f) calcular el coeficiente de correlación de Spearman (r) para cada par de miARN biomarcador potencial seleccionado en la etapa (e), y
- (g) identificar el par de miARN como un par biomarcador adecuado para el diagnóstico y/o monitoreo de dicha patología si su valor (r) calculado en la etapa (f) es al menos 0,8.

En un aspecto relacionado, se describe un método para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:

- (a) seleccionar al menos cuatro miARN que se sabe que están enriquecidos en un órgano afectado por la patología;
- (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- (c) calcular el coeficiente de correlación de Spearman (r) para todos los posibles pares de miARN individuales medidos en la etapa (b);
- (d) seleccionar como pares biomarcadores potenciales aquellos pares de miARN que tienen el valor (r) calculado en la etapa (c) de al menos 0,8;
- (e) calcular el nivel medio de cada miARN seleccionado en la etapa (d);
- (f) calcular la diferencia entre los niveles medios de miARN calculados en la etapa (e);
- (g) identificar un par de miARN como par biomarcador adecuado para el diagnóstico y/o monitoreo de dicha patología si la diferencia calculada en la etapa (f) para un miARN es al menos 1,5 veces la diferencia calculada para el otro miARN.

En otro aspecto relacionado, se describe un método para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:

- (a) seleccionar al menos cuatro miARN que se sabe que están enriquecidos en un órgano afectado por la patología;
- 5 (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- (c) calcular el coeficiente de correlación de Spearman (r) para todos los posibles pares de miARN individuales medidos en la etapa (b);
- 10 (d) seleccionar como pares biomarcadores potenciales aquellos pares de miARN que tienen el valor (r) calculado en la etapa (c) de al menos 0,8;
- (e) calcular el valor P de la separación de dos cohortes de sujetos para cada par de miARN seleccionado en la etapa (d), y
- 15 (f) identificar un par de miARN como un par biomarcador adecuado para el diagnóstico y/o monitoreo de dicha patología si este par diferencia dos cohortes de sujetos con un valor de P estadísticamente significativo.
- En aún otro aspecto relacionado, se describe un método implementado por ordenador para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:
- 20 (a) seleccionar un grupo de miARN que se sabe que está enriquecido en un órgano afectado por la patología;
- 25 (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- (c) calcular electrónicamente el nivel medio de cada miARN medido en la etapa (b);
- 30 (d) calcular electrónicamente una diferencia entre los niveles medios de miARN calculados en la etapa (c);
- (e) seleccionar del grupo de miARN medidos un conjunto de pares de miARN potenciales que comprenden cada uno un primer miARN y un segundo miARN, en donde la diferencia calculada en el nivel medio en la etapa (d) del primer miARN es al menos 1,5 veces la diferencia calculada en el nivel medio del segundo miARN;
- 35 (f) calcular electrónicamente el coeficiente de correlación de Spearman (r) para cada par de miARN potencial seleccionado en (e);
- (g) seleccionar del conjunto de pares de miARN potenciales aquellos pares de miARN adecuados para el diagnóstico y/o monitoreo de la patología, en donde el valor (r) calculado en la etapa (f) es al menos 0,8, y
- 40 (h) presentar todos o parte de los pares de miARN seleccionados en la etapa (g).
- En un aspecto adicional relacionado, se describe un método implementado por ordenador para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:
- 45 (a) seleccionar un grupo de miARN que se sabe que está enriquecido en un órgano afectado por la patología;
- 50 (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- (c) calcular electrónicamente el coeficiente de correlación de Spearman (r) para todos los posibles pares de miARN individuales medidos en la etapa (b);
- 55 (d) seleccionar del grupo de miARN medidos un conjunto de pares de miARN biomarcadores potenciales, en donde el valor (r) calculado en la etapa (c) es al menos 0,8;
- (e) calcular electrónicamente el nivel medio de cada miARN seleccionado en la etapa (d);
- 60 (f) calcular electrónicamente la diferencia entre los niveles medios de miARN calculados en la etapa (e);
- (g) seleccionar del grupo de miARN medidos un conjunto de pares de miARN biomarcadores adecuados, cada uno que comprende un primer miARN y un segundo miARN, en donde para cada par de miARN biomarcador adecuado, la diferencia calculada en el nivel medio en la etapa (f) del primer miARN es al menos 1,5 veces la diferencia calculada en el nivel medio del segundo miARN, y
- 65



(h) presentar todos o parte de los pares de miARN biomarcadores adecuados seleccionados en la etapa (g).

5 En un aspecto adicional relacionado, se describe un método implementado por ordenador para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:

(a) seleccionar un grupo de miARN que se sabe que está enriquecido en un órgano afectado por la patología;

10 (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;

15 (c) calcular electrónicamente el coeficiente de correlación Spearman (r) de los niveles medidos en la etapa (b) para todos los posibles pares de miARN individuales;

(d) seleccionar del grupo de miARN medidos un conjunto de pares de miARN biomarcadores potenciales, en donde el valor (r) calculado en la etapa (c) es al menos 0,8;

20 (e) calcular electrónicamente el valor P de la separación de dos cohortes de sujetos para cada par de miARN seleccionado en la etapa (d);

(f) seleccionar un par de miARN como un par biomarcador adecuado para el diagnóstico y/o monitoreo de dicha patología si este par de miARN diferencia dos cohortes de sujetos con un valor P estadísticamente significativo, y

25 (g) presentar todos o parte de los pares de miARN biomarcadores adecuados seleccionados en la etapa (f).

En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, el nivel de miARN se mide mediante un método seleccionado del grupo que consiste en métodos basados en RT-PCR, métodos basados en matrices de miARN, secuenciación de nueva generación e hibridación.

30 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, las dos cohortes de sujetos son (1) sujetos que tienen la patología y (2) sujetos sanos agrupados por edad, género y etnia. En otra modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, las dos cohortes de sujetos son sujetos que tienen dos patologías diferentes del órgano. En aún otra modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, las dos cohortes de sujetos son (1) sujetos más jóvenes y (2) sujetos más viejos. En una modalidad adicional de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, las dos cohortes de sujetos son (1) machos y (2) hembras agrupados por edad y etnia.

40 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, el fluido corporal se selecciona del grupo que consiste en plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (CSF), orina y saliva.

45 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, el sujeto es humano. En otra modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, el sujeto es un animal de experimentación.

50 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador que implica un valor P, el valor P se calcula en la etapa (e) mediante el uso de la prueba de Mann-Whitney. En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador que implica un valor P, el valor P estadísticamente significativo es al menos 0,05.

55 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, la patología es una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD) y deterioro cognitivo leve (MCI)).

En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores para seleccionar un par de miARN biomarcador, el órgano afectado por la patología es el cerebro.

60 Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica en la siguiente descripción, reivindicaciones y dibujos.

Breve descripción de los dibujos

65 Las **Figuras 1A-F** son gráficos que muestran las relaciones de los niveles de miARN (pares biomarcadores) en el plasma de pacientes controles de la misma edad (AMC) y con enfermedad de Parkinson (PD). **A, C y E** presentan diagramas de caja y bigotes en la escala Log<sub>10</sub>. Los límites superior e inferior de las cajas y las líneas dentro de las

cajas indican los percentiles 75 y 25 y la mediana, respectivamente. Las barras horizontales superior e inferior denotan los percentiles 90 y 10, respectivamente. Los puntos indican valores de ensayo ubicados fuera del 80 % de los datos. **B, D y F** presentan el análisis de diferenciación de las Curvas de Rendimiento Diagnóstico (ROC) entre los pacientes con PD y AMC. La sensibilidad, la especificidad y la precisión para cada par biomarcador/normalizador se calculan para el punto de "corte" (indicado como un punto en cada gráfica), el valor de la relación de miARN emparejado donde la precisión de las predicciones es la más alta.

Las **Figuras 2A-F** son gráficos que muestran las relaciones de los niveles de miARN (pares biomarcadores) en el plasma de pacientes con MCI y PD. **A, C y E** presentan diagramas de caja y bigotes en la escala Log10. Los límites superior e inferior de las cajas y las líneas dentro de las cajas indican los percentiles 75 y 25 y la mediana, respectivamente. Las barras horizontales superior e inferior denotan los percentiles 90 y 10, respectivamente. Los puntos indican valores de ensayo ubicados fuera del 80 % de los datos. **B, D y F** presentan el análisis de diferenciación de las Curvas de Rendimiento Diagnóstico (ROC) entre los pacientes con PD y MCI. La sensibilidad, la especificidad y la precisión para cada par biomarcador/normalizador se calculan para el punto de "corte" (indicado como un punto en cada gráfica), el valor de la relación de miARN emparejado donde la precisión de las predicciones es la más alta.

Las **Figuras 3A-F** son gráficos que muestran las relaciones de los niveles de miARN (pares biomarcadores) en el plasma de pacientes con AD y PD. **A, C y E** presentan diagramas de caja y bigotes en la escala Log10. Los límites superior e inferior de las cajas y las líneas dentro de las cajas indican los percentiles 75 y 25 y la mediana, respectivamente. Las barras horizontales superior e inferior denotan los percentiles 90 y 10, respectivamente. Los puntos indican valores de ensayo ubicados fuera del 80 % de los datos. **B, D y F** presentan el análisis de diferenciación de las Curvas de Rendimiento Diagnóstico (ROC) entre los pacientes con PD y AMC. La sensibilidad, la especificidad y la precisión para cada par biomarcador/normalizador se calculan para el punto de "corte" (indicado como un punto en cada gráfica), el valor de la relación de miARN emparejado donde la precisión de las predicciones es la más alta.

Las **Figuras 4A-C** presentan el análisis de diferenciación de las Curvas de Rendimiento Diagnóstico (ROC) entre pacientes con PD y AMC (**A**), pacientes con PD y MCI (**B**) y pacientes con PD y AD (**C**). La sensibilidad, la especificidad y la precisión para cada par biomarcador/normalizador y su combinación se calculan para el punto de "corte" (indicado como un punto en cada gráfica), el valor de la relación de miARN emparejado donde la precisión de las predicciones es la más alta.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en las siguientes ideas y descubrimientos realizados por los presentes inventores:

(1) los cambios en las concentraciones de miARN circulantes enriquecidos en el cerebro, y más específicamente en las áreas del cerebro involucradas en una patología particular, son más probables que reflejen procesos patológicos asociados en el cerebro que los miARN ubicuos u otros miARN enriquecidos en el cerebro;

(2) los miARN presentes en neuritas y sinapsis deben analizarse, porque la disfunción y destrucción de neuritas y sinapsis es característica de las etapas tempranas de la neurodegeneración y, por lo tanto, puede afectar la expresión y secreción de estos miARN;

(3) para compensar procesos no relacionados directamente con una patología particular, por ejemplo, cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, los presentes inventores usaron el enfoque de "par biomarcador" que normaliza los miARN enriquecidos en neuronas de área(s) del cerebro dañada(s) con otros miARN enriquecidos en el cerebro, que podrían expresarse en áreas del cerebro o tipos de células no involucradas en etapas tempranas de una enfermedad neurodegenerativa específica que se está diagnosticando, así como también con miARN con niveles plasmáticos que cambian de manera diferente en comparación con miARN enriquecidos en el área de interés;

(4) la alta correlación de las concentraciones plasmáticas de los miARN usados como numerador y denominador en un par de miARN biomarcador es muy importante para su sensibilidad y especificidad.

La presente invención se basa en el análisis de las relaciones de los niveles de pares de miARN libres de células circulantes en los fluidos corporales, en donde ambos miARN del par están enriquecidos en el cerebro y (i) están enriquecidos en ciertas áreas del cerebro, que están (para un miARN en el par) o no están (para el otro miARN en el par) involucradas en el desarrollo de la PD, o (ii) están enriquecidos en diferentes tipos de células (por ejemplo, neuronas y células gliales), o (iii) están enriquecidos en la misma área del cerebro pero cuya expresión y/o secreción cambian de manera diferente debido al desarrollo de la PD. Los miARN enriquecidos en el cerebro que son particularmente útiles como numeradores en los pares de miARN de la invención incluyen miARN neuronales presentes en neuritas y sinapsis (es decir, miARN de sinapsis y/o neuritas), cuyo funcionamiento normal se ve afectado en las etapas tempranas de la PD, AD y otras enfermedades neurodegenerativas. La presente invención también abarca el análisis de miARN implicados en procesos inflamatorios (por ejemplo, miR-155) y su uso como biomarcadores potenciales en combinación con miARN enriquecidos en área(s) del cerebro implicada(s) en la patología. Dado que varias enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por patología neuronal en diferentes áreas del cerebro, tales pares de miARN biomarcadores pueden usarse para diferenciar esas patologías entre sí

independientemente de sus síntomas clínicos, si los hay. Además, los biomarcadores descubiertos, que reflejan eventos importantes en el desarrollo de la patología, podrían usarse para el monitoreo de enfermedades y tratamientos, así como también para la detección de fármacos.

5 El uso de miARN enriquecido en el cerebro aumenta significativamente las posibilidades de que los cambios en sus niveles en plasma sean causados por patología cerebral, y los cambios en la concentración en fluidos corporales de miARN enriquecido en un área particular del cerebro deberían ser indicativos de patología en esa parte del cerebro. Por ejemplo, los cambios en los niveles de miARN enriquecido en el hipocampo o en el mesencéfalo se asociarían respectivamente con la AD y la PD, lo que refleja disfunciones de sinapsis y neuronales en estas áreas del cerebro.  
10 Además, las concentraciones de miARN enriquecido en órganos en las células sanguíneas son bajas, lo que disminuye la contaminación del plasma y el suero por la fuga de miARN durante la purificación de estos fluidos corporales.

15 Las concentraciones de miARN detectadas en los fluidos corporales dependen de muchos factores biológicos y técnicos. Los factores biológicos incluyen niveles de miARN en varios tejidos, intensidad de secreción y excreción hacia el espacio extracelular, formas de miARN circulantes (exosomas y otras vesículas, complejos con proteínas y lípidos) que afectan su capacidad para cruzar varias barreras, por ejemplo, las barreras hematoencefálica, placentar y renal y estabilidad y vida media del miARN en el torrente sanguíneo. Los factores técnicos incluyen la variabilidad en los métodos de recolección y almacenamiento de los fluidos corporales, los métodos usados para la extracción de miARN y la presencia en los fluidos corporales de varios factores que afectan la purificación y cuantificación de miARN.  
20 Como consecuencia, la importancia de la normalización de miARN se reconoce ampliamente (Meyer y otros, *Biotechnol. Lett.* 2010; 32: 1777-1788). Al mismo tiempo, no se acepta comúnmente ningún método de normalización.

25 La presente invención se basa en el uso de pares de miARN enriquecidos en el cerebro en lugar de (o además de) la normalización por ARN ubicuo o un promedio de numerosos miARN. El uso de pares de miARN enriquecidos en el cerebro (uno como numerador y otro como denominador en una relación) tiene varias ventajas. En primer lugar, cualquier patología se asocia usualmente con una regulación al alza de algunos miARN y una regulación a la baja de otros miARN, por lo que se considera que los pares de miARN de miARN regulados al alza y a la baja pueden aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba. En segundo lugar, el uso de un par de miARN enriquecidos en el cerebro, en lugar de un miARN enriquecido en el cerebro, disminuye la superposición potencial con patologías de otros órganos.  
30 En tercer lugar, se puede esperar que los cambios no relacionados o no específicos de una patología de interés, tales como, por ejemplo, cambios en el suministro de sangre, la permeabilidad hematoencefálica y otros, se compensen mejor mediante el uso del par de miARN enriquecidos en el mismo órgano. Por ejemplo, los cambios en las concentraciones relativas de miARN enriquecidos en diferentes áreas del cerebro o diferentes tipos de células (por ejemplo, neuronas y células gliales) pueden ser un indicador de la progresión de la enfermedad, etc.

35 En la presente invención, dado que varios miARN están involucrados en la regulación de diferentes procesos, también se probó la combinación de varios pares de miARN para encontrar los grupos de pares de miARN que proporcionan la mayor precisión de la prueba. Los ejemplos no limitantes de tales grupos incluyen miR-181b/miR-323-3p plus miR-99b/miR-9\*; miR-491-5p/miR-487b plus miR-9/miR-146a; miR-491-5p/miR-210 plus miR-181a/miR-146b (consulte la Figura 4).  
40

### **Definiciones**

45 Como se usa en la presente descripción en relación con el enriquecimiento en el cerebro, el término "enriquecido" significa que la concentración de miARN en el cerebro es al menos 4-5 veces mayor que en otros órganos.

50 Como se usa en la presente descripción en relación con el enriquecimiento en una determinada área del cerebro, el término "enriquecido" significa que la concentración de miARN en dicha área del cerebro es mayor (preferentemente, al menos 2 veces mayor, con mayor preferencia al menos 5 veces mayor, con la máxima preferencia al menos 10 veces mayor) que en el cerebro en general. El término se refiere a la diferencia de concentraciones dentro de las áreas del cerebro (por ejemplo, según se mide mediante el uso de qRT-PCR).

55 En el sentido de la presente invención, el término "miARN de sinapsis y/o neuritas" se refiere a miARN que (i) está "enriquecido en el cerebro" y (ii) está presente en una sinapsis y/o neurita (es decir, axón y/o dendrita y/o espina). Para ser útiles en los métodos de la presente invención, los miARN de sinapsis y/o neuritas deben ser detectables en fluidos corporales como resultado de su liberación desde las neuronas (por ejemplo, debido a la secreción, destrucción de neuritas/sinapsis o muerte neuronal).

60 El término "Deterioro Cognitivo Leve" o "MCI" se refiere a una etapa intermedia entre la decadencia cognitiva esperada del envejecimiento normal y la decadencia más grave de la demencia. Puede implicar problemas con la memoria, el lenguaje, el pensamiento y el juicio que son mayores que los cambios normales relacionados con la edad (ver, por ejemplo, Jack y otros, *Alzheimer's and Dementia*. 2011, Epub 19 de abril).

65 El término "neurita" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier proyección desde el cuerpo celular de una neurona. Esta proyección puede ser un axón, una dendrita o una espina.

El término "axón" se refiere a una proyección larga y delgada de una neurona que conduce impulsos eléctricos lejos del cuerpo celular de la neurona o el soma. Los axones se distinguen de las dendritas por varias características, que incluyen la forma (las dendritas a menudo se estrechan mientras que los axones suelen mantener un radio constante), la longitud (las dendritas están restringidas a una pequeña región alrededor del cuerpo celular, mientras que los axones pueden ser mucho más largos) y la función (las dendritas usualmente reciben señales mientras que los axones generalmente las transmiten). Los axones y las dendritas pueden entrar en contacto con otras células (usualmente otras neuronas, pero a veces células de músculos o glándulas) en uniones llamadas sinapsis.

El término "dendrita" se refiere a una proyección ramificada de una neurona que actúa para conducir la estimulación electroquímica recibida desde otras células neurales al cuerpo celular de la neurona desde la que se proyectan las dendritas.

El término "sinapsis" se refiere a las uniones especializadas, a través de las cuales las neuronas envían señales entre sí y a células no neuronales, tales como las de los músculos o las glándulas. Una neurona típica da lugar a varios miles de sinapsis. La mayoría de las sinapsis conectan axones con dendritas, pero también hay otros tipos de conexiones, que incluyen axón a cuerpo celular, axón a axón y dendrita a dendrita. En el cerebro, cada neurona forma sinapsis con muchas otras y, de la misma manera, cada una recibe entradas sinápticas de muchas otras. Como resultado, la salida de una neurona puede depender de la entrada de muchas otras, cada una de las cuales puede tener un grado de influencia diferente, en dependencia de la fuerza de su sinapsis con esa neurona. Hay dos tipos principales de sinapsis, sinapsis químicas y sinapsis eléctricas. En las sinapsis eléctricas, las células se acercan a unos 3,5 nm entre sí, en lugar de la distancia de 20 a 40 nm que separa las células en las sinapsis químicas. En las sinapsis químicas, el potencial postsináptico es causado por la apertura de canales iónicos mediante transmisores químicos, mientras que en las sinapsis eléctricas es causado por el acoplamiento eléctrico directo entre ambas neuronas. Las sinapsis eléctricas son, por tanto, más rápidas que las sinapsis químicas.

El término "miARN normalizador" como se usa en la presente descripción se refiere a miARN que se usa para la normalización de la concentración de miARN para explicar varios factores que afectan la apariencia y estabilidad de miARN en plasma.

El término "enfermedad neurodegenerativa" se usa en la presente descripción para referirse a patologías cerebrales, tales como, por ejemplo, enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Alzheimer (AD), Deterioro Cognitivo Leve (MCI), enfermedad de Huntington (HD), enfermedades causadas por priones, demencia frontotemporal (FTD), demencia con cuerpos de Lewy, demencias vasculares, Esclerosis Tardía Amiotrófica (ALS), Encefalopatía Traumática Crónica (CTE), parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (MSA), degeneración corticobasal (CBGD), enfermedad de Pick, atrofia olivopontocerebelosa (OPCA) y otras patologías caracterizadas por cambios metabólicos, seguidos de disfunción de la sinapsis, destrucción de neuritas y sinapsis y, en última instancia, muerte neuronal.

Como se usa en la presente descripción, el término "etapa de desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa" se refiere a un grado específico de gravedad de una enfermedad neurodegenerativa (por ejemplo, etapa asintomática, enfermedad temprana con algunos síntomas, etapas tardías de la enfermedad, etc.).

El término "desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa" se usa en la presente descripción para referirse a cualquier cambio negativo en el grado/gravedad de un cambio metabólico y/o estructural en neuronas individuales y/o cualquier aumento en el número de neuronas afectadas. La frase "mejora de una enfermedad neurodegenerativa" y términos similares se refieren a cualquier cambio positivo en el grado/gravedad de un cambio metabólico y/o estructural en neuronas individuales y/o cualquier disminución en el número de neuronas afectadas.

El término "asociado con" se usa para abarcar cualquier correlación, co-ocurrencia y cualquier relación de causa y efecto.

Los términos "microARN" o "miARN" como se usan en la presente descripción se refieren a una clase de moléculas pequeñas de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nt de longitud. Desempeñan funciones importantes en la regulación de genes diana al unirse a regiones complementarias de transcritos de mensajeros (ARNm) para reprimir su traducción o regular la degradación (Griffiths-Jones *Nucleic Acids Research*, 2006, 34, número en la base de datos: D140-D144). Con frecuencia, un miARN puede dirigirse a múltiples ARNm y un ARNm puede ser regulado por múltiples miARN dirigidos a diferentes regiones de la 3' UTR. Una vez unido a un ARNm, el miARN puede modular la expresión génica y la producción de proteínas al afectar, por ejemplo, la traducción y estabilidad del ARNm (Baek y otros, *Nature* 455(7209):64 (2008); Selbach y otros, *Nature* 455(7209):58 (2008); Ambros, 2004, *Nature*, 431, 350-355; Bartel, 2004, *Cell*, 116, 281-297; Cullen, 2004, *Virus Research*, 102, 3-9; He y otros, 2004, *Nat. Rev. Genet.*, 5, 522-531; and Ying y otros, 2004, *Gene*, 342, 25-28). A menos que se indique lo contrario, el nombre de un miARN específico se refiere a una secuencia de miARN madura. Según las reglas de nomenclatura actuales, los miARN humanos se preceden por el prefijo "hsa-" (es decir, una abreviatura de *Homo sapiens*). A lo largo de la descripción y las figuras, el prefijo hsa- puede eliminarse para abreviar, por lo que, por ejemplo, "hsa-miR-155" y "miR-155" representarían la misma secuencia de ARN.

Los ejemplos de miARN de neuritas y/o sinapsis útiles en los métodos descritos en la presente descripción incluyen, sin limitación, Let-7e, miR-7, miR-9, miR-98, miR-99, miR-124a, miR-125a, miR-125b, miR-128a, miR-132, miR-134, miR-135a, miR-137, miR-138, miR-154, miR-182, miR-183, miR-213, miR-218, miR-323-3p, miR-329, miR-337, miR-369-3, miR-369-5p, miR-370, miR-381, miR-382, miR-409-3p, miR-425, miR-433-5p, miR-483-3p, miR-485-5p, miR-487b, miR-491-5p, miR-494, miR-495, miR-496, miR-541, miR-543, miR-656, miR-668, miR-874, miR-889, miR-935, miR-939, miR-9\* and miR181a-1\*. Se puede encontrar información sobre la mayoría de los miARN conocidos actualmente en la base de datos de miARN miRBase (disponible en la red mundial en mirbase.org). Véase también Burside y otros, BMC Genomics 9: 185 (2008); Williams y otros, BMC Genomics 8: 172 (2007); Landgraf y otros, Cell 129: 1401 (2007).

El término "matriz de miARN" se refiere a una tecnología multiplex usada en biología molecular y en medicina. Consiste en una serie ordenada de múltiples (por ejemplo, miles) puntos microscópicos de oligonucleótidos, cada uno de los cuales contiene una secuencia específica (sonda) complementaria a un miARN diana particular. Después de la hibridación sonda-diana en condiciones de alta rigurosidad, los híbridos resultantes usualmente se detectan y cuantifican mediante la cuantificación de dianas marcadas con fluoróforo, plata o quimioluminiscencia para determinar la abundancia relativa de miARN. En los métodos descritos en la presente descripción, se pueden usar matrices de miARN tanto hechas a medida como disponibles comercialmente. Los ejemplos de matrices de miARN útiles disponibles comercialmente (basadas en varios métodos de marcado de diana, detección y análisis de híbridos) incluyen matrices producidas por Agilent, Illumina, Invitrogen, Febit y LC Sciences.

El término "tecnologías de secuenciación de nueva generación" se refiere ampliamente a métodos de secuenciación que generan múltiples reacciones de secuenciación en paralelo. Esto permite un mayor rendimiento y obtención de los datos. Los ejemplos no limitantes de plataformas de secuenciación de nueva generación de uso común incluyen secuenciación de ARN pequeño de Helicos, miARN BeadArray (Illumina), Roche 454 (FLX-Titanium) y ABI SOLiD.

Un "individuo" o "sujeto" o "animal", como se usa en la presente descripción, se refiere a humanos, animales veterinarios (por ejemplo, gatos, perros, vacas, caballos, ovejas, cerdos, etc.) y modelos animales experimentales de enfermedades neurodegenerativas. En una modalidad preferida, el sujeto es un humano.

El término "purificado" como se usa en la presente descripción se refiere a material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluidos los materiales nativos de los que se obtiene el material. Por ejemplo, la purificación de ARN incluye la eliminación de proteínas, lípidos, sales y otros compuestos no relacionados presentes en los fluidos corporales. Además, para algunos métodos de análisis, un miARN purificado preferentemente está sustancialmente libre de otros oligonucleótidos de ARN contenidos en muestras de fluidos corporales (por ejemplo, ARNr y fragmentos de ARNm, miARN ubicuos, que se expresan a niveles altos en casi todos los tejidos [por ejemplo, miR-16], etc.). Como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente libre" se usa operativamente, en el contexto de pruebas analíticas del material. Preferentemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos 50 % puro; con mayor preferencia, al menos 90 % puro, y aún con mayor preferencia al menos 99 % puro. La pureza se puede evaluar mediante cromatografía, electroforesis en gel, análisis de composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica.

Como se usa en la presente descripción, el término "procesado de manera similar" se refiere a muestras (por ejemplo, muestras de fluido corporal o ARN purificados) que se han obtenido mediante el uso del mismo protocolo.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Tal un intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro del 50 %, con mayor preferencia dentro del 20 %, aún con mayor preferencia dentro del 10 %, e incluso con mayor preferencia dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por el término "alrededor de" o "aproximadamente" depende del sistema particular en estudio y puede ser fácilmente apreciada por un experto en la técnica.

De acuerdo con la presente invención, se pueden emplear técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro del conocimiento de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 (en la presente descripción "Sambrook y otros, 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II (D.N. Glover ed. 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed. 1984); Nucleic Acid Hybridization [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; Transcription And Translation [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; Animal Cell Culture [R.I. Freshney, ed. (1986)]; Immobilized Cells And Enzymes [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); Ausubel, F.M. y otros, (eds.). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., 1994. Estas técnicas incluyen mutagénesis sitio dirigida como se describe en Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 82: 488- 492 (1985), Patente de Estados Unidos núm. 5,071, 743, Fukuoka y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun. 263: 357-360 (1999); Kim y Maas, BioTech. 28: 196-198 (2000); Parikh y Guengerich, BioTech. 24: 4 28-431 (1998); Ray y Nickoloff, BioTech. 13: 342-346 (1992); Wang y otros, BioTech. 19: 556-559 (1995); Wang y Malcolm, BioTech. 26: 680-682 (1999); Xu y Gong, BioTech. 26: 639-641 (1999), Patentes de Estados Unidos núms. 5,789, 166 y 5,932, 419, Hogrefe, Strategies 14. 3: 74-75 (2001), Patentes de Estados Unidos núms. 5,702,931, 5,780,270, y 6,242,222, Angag y Schutz, Biotech. 30: 486-488 (2001),

Wang y Wilkinson, Biotech. 29: 976-978 (2000), Kang y otros, Biotech. 20: 44-46 (1996), Ogel y McPherson, Protein Engineer. 5: 467-468 (1992), Kirsch y Joly, Nucl. Acids. Res. 26: 1848-1850 (1998), Rhem y Hancock, J. Bacteriol. 178: 3346-3349 (1996), Boles y Miogsa, Curr. Genet. 28: 197-198 (1995), Barrentino y otros, Nuc. Acids. Res. 22: 541-542 (1993), Tessier y Thomas, Meths. Molec. Biol. 57: 229-237, y Pons y otros, Meth. Molec. Biol. 67: 209-218.

5

### **Métodos para la Identificación de Pares de miARN de Diagnóstico**

Para identificar los pares biomarcadores más prometedores, los presentes inventores usaron el siguiente enfoque: selección de un numerador y un denominador para cada par a partir de los miARN circulantes, que se correlacionan significativamente (coeficiente de correlación de Spearman  $r > 0,8$ ) en un fluido corporal respectivo de diferentes individuos. Las concentraciones de miARN en plasma dependen de numerosos factores, que incluyen (i) los niveles de expresión de miARN en varios órganos y tejidos; (ii) niveles de secreción de miARN de diferentes tipos de células; (iii) estabilidad de los miARN en el espacio extracelular y su aparición en el plasma en diferentes formas, tales como exosomas y otras microvesículas, complejos con proteínas, lípidos y, posiblemente, otras moléculas; y (iv) permeabilidad de la barrera hematoencefálica para miARN enriquecidos en el cerebro. Un proceso patológico puede afectar algunos o todos estos factores. Los presentes inventores sugieren que un nominador y un denominador de un par de miARN biomarcador efectivo deberían compartir algunos de estos factores comunes básicos (por ejemplo, ambos están enriquecidos en el cerebro y se secretan en exosomas) y cambiarían de manera diferente en respuesta a una patología. Esto no significa que cualquier miARN correlacionado formará un buen par biomarcador, ya que si la patología los cambia de manera similar, su relación enmascarará esos cambios.

10

15

20

La presente descripción proporciona un método de selección de par de miARN "prometedor", cuyo método comprende las siguientes etapas:

25

1. Las concentraciones de miARN preseleccionados sobre la base de su enriquecimiento en un órgano de interés (por ejemplo, cerebro) se miden en un fluido corporal (por ejemplo, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (CSF), saliva, orina) de al menos dos cohortes comparativas (por ejemplo, una enfermedad y control para una prueba de diagnóstico, dos enfermedades para una prueba capaz de diferenciar dos patologías, una enfermedad en diferentes etapas de desarrollo del proceso patológico o una enfermedad antes y después del tratamiento para las pruebas de monitoreo).

30

2. Las medias de cada concentración de miARN se calculan para las cohortes comparativas.

35

3. Se calcula la diferencia entre las medias para cada miARN de las dos cohortes comparativas y los miARN se dividen en dos grupos: (i) con valores de diferencia alta; y (ii) con valores de diferencia bajos o de signo opuesto.

40

4. Los miARN de diferentes grupos se combinan como pares biomarcadores potenciales si los parámetros determinados en la etapa 3 difieren al menos 1,5 veces. Un miARN se usa como un numerador y otro miARN se usa como un denominador en un par potencial de miARN "prometedor".

45

5. Para reducir aún más el impacto de las variaciones individuales de cada concentración de miARN particular en plasma u otro fluido corporal, el miARN con alta correlación positiva (coeficiente de correlación de Spearman  $r$  calculado para todas las muestras en los grupos comparados es  $> 0,8$ ) se selecciona como un numerador y un denominador para el par biomarcador. Esta etapa disminuye significativamente el número de pares de miARN biomarcadores potenciales, reduce la varianza de los biomarcadores seleccionados causada por factores no relacionados con los procesos que diferencian dos cohortes comparativas y aumenta significativamente la sensibilidad y la especificidad de la prueba.

50

El orden de las etapas 3-4 y la etapa 5 se puede cambiar de la siguiente manera:

55

Después de la etapa 1, calcular el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) para todos los posibles pares de miARN individuales medidos en la etapa 1 en todas las muestras de fluido corporal. A continuación, seleccionar como posibles pares de miARN biomarcadores con una alta correlación positiva ( $r > 0,8$ ), comparar una relación de concentraciones de miARN en dos cohortes de sujetos para cada par de miARN seleccionado y determinar un par de miARN como un biomarcador adecuado si este par diferencia dos cohortes de sujetos con un valor de  $P$  estadísticamente significativo.

60

La selección de miARN para pares biomarcadores es una etapa importante en el desarrollo de pruebas de detección, diagnóstico y monitoreo basadas en el análisis de miARN circulantes libres de células en los fluidos corporales. La presente descripción aborda este problema al proporcionar los siguientes métodos para la selección de pares biomarcadores efectivos.

65

En una modalidad, la descripción proporciona un método para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:

(a) seleccionar al menos cuatro miARN que se sabe que están enriquecidos en un órgano afectado por la patología;

- (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- 5 (c) calcular el nivel medio de cada miARN medido en la etapa (b);
- (d) calcular la diferencia entre los niveles medios de miARN calculada en la etapa (c);
- 10 (e) comparar las diferencias entre los niveles medios de miARN calculados en la etapa (d) entre todos los miARN estudiados y seleccionar como pares biomarcadores potenciales aquellos pares de miARN para los que la diferencia calculada en la etapa (d) para un miARN es al menos 1,5 veces la diferencia calculada para el otro miARN;
- (f) calcular el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) para cada par de miARN biomarcador potencial seleccionado en la etapa (e); y
- 15 (g) identificar el par de miARN como un par biomarcador adecuado para el diagnóstico y/o monitoreo de dicha patología si su valor ( $r$ ) calculado en la etapa (f) es al menos 0,8.
- En otra modalidad, la descripción proporciona un método para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:
- 20 (a) seleccionar al menos cuatro miARN que se sabe que están enriquecidos en un órgano afectado por la patología;
- (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- 25 (c) calcular el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) para todos los posibles pares de miARN individuales medidos en la etapa (b);
- 30 (d) seleccionar como pares biomarcadores potenciales aquellos pares de miARN que tienen el valor ( $r$ ) calculado en la etapa (c) de al menos 0,8;
- (e) calcular el nivel medio de cada miARN seleccionado en la etapa (d);
- 35 (f) calcular la diferencia entre los niveles medios de miARN calculados en la etapa (e);
- (g) identificar un par de miARN como par biomarcador adecuado para el diagnóstico y/o monitoreo de dicha patología si la diferencia calculada en la etapa (f) para un miARN es al menos 1,5 veces la diferencia calculada para el otro miARN.
- 40 En una modalidad adicional, la descripción proporciona un método para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:
- 45 (a) seleccionar al menos cuatro miARN que se sabe que están enriquecidos en un órgano afectado por la patología;
- (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- 50 (c) calcular el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) para todos los posibles pares de miARN individuales medidos en la etapa (b);
- (d) seleccionar como pares biomarcadores potenciales aquellos pares de miARN que tienen el valor ( $r$ ) calculado en la etapa (c) de al menos 0,8;
- 55 (e) calcular el valor P de la separación de dos cohortes de sujetos para cada par de miARN seleccionado en la etapa (d), y
- 60 (f) identificar un par de miARN como un par biomarcador adecuado para el diagnóstico y/o monitoreo de dicha patología si este par diferencia dos cohortes de sujetos con un valor de P estadísticamente significativo.
- En otra modalidad, la descripción proporciona un método implementado por ordenador para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:
- 65

- (a) seleccionar un grupo de miARN que se sabe que está enriquecido en un órgano afectado por la patología;
- (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- 5 (c) calcular electrónicamente el nivel medio de cada miARN medido en la etapa (b);  
 (d) calcular electrónicamente una diferencia entre los niveles medios de miARN calculados en la etapa (c);
- 10 (e) seleccionar del grupo de miARN medidos un conjunto de pares de miARN potenciales que comprenden cada uno un primer miARN y un segundo miARN, en donde la diferencia calculada en el nivel medio en la etapa (d) del primer miARN es al menos 1,5 veces la diferencia calculada en el nivel medio del segundo miARN;
- (f) calcular electrónicamente el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) para cada par de miARN potencial seleccionado en (e);
- 15 (g) seleccionar del conjunto de pares de miARN potenciales aquellos pares de miARN adecuados para el diagnóstico y/o monitoreo de la patología, en donde el valor ( $r$ ) calculado en la etapa (f) es al menos 0,8, y
- (h) presentar todos o parte de los pares de miARN seleccionados en la etapa (g).
- 20 En aún otra modalidad, la descripción proporciona un método implementado por ordenador para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:
- 25 (a) seleccionar un grupo de miARN que se sabe que está enriquecido en un órgano afectado por la patología;
- (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- 30 (c) calcular electrónicamente el coeficiente de correlación de Spearman ( $r$ ) para todos los posibles pares de miARN individuales medidos en la etapa (b);
- (d) seleccionar del grupo de miARN medidos un conjunto de pares de miARN biomarcadores potenciales, en donde el valor ( $r$ ) calculado en la etapa (c) es al menos 0,8;
- 35 (e) calcular electrónicamente el nivel medio de cada miARN seleccionado en la etapa (d);  
 (f) calcular electrónicamente la diferencia entre los niveles medios de miARN calculados en la etapa (e);
- 40 (g) seleccionar del grupo de miARN medidos un conjunto de pares de miARN biomarcadores adecuados, cada uno que comprende un primer miARN y un segundo miARN, en donde para cada par de miARN biomarcador adecuado, la diferencia calculada en el nivel medio en la etapa (f) del primer miARN es al menos 1,5 veces la diferencia calculada en el nivel medio del segundo miARN, y
- 45 (h) presentar todos o parte de los pares de miARN biomarcadores adecuados seleccionados en la etapa (g).
- En una modalidad adicional, la descripción proporciona un método implementado por ordenador para seleccionar un par de miARN biomarcador para el diagnóstico y/o monitoreo de una patología, dicho método que comprende las siguientes etapas:
- 50 (a) seleccionar un grupo de miARN que se sabe que está enriquecido en un órgano afectado por la patología;
- (b) medir el nivel de cada miARN seleccionado en la etapa (a) en muestras de fluido corporal de dos cohortes de sujetos;
- 55 (c) calcular electrónicamente el coeficiente de correlación Spearman ( $r$ ) de los niveles medidos en la etapa (b) para todos los posibles pares de miARN individuales;
- (d) seleccionar del grupo de miARN medidos un conjunto de pares de miARN biomarcadores potenciales, en donde el valor ( $r$ ) calculado en la etapa (c) es al menos 0,8;
- 60 (e) calcular electrónicamente el valor P de la separación de dos cohortes de sujetos para cada par de miARN seleccionado en la etapa (d);
- 65 (f) seleccionar un par de miARN como un par biomarcador adecuado para el diagnóstico y/o monitoreo de dicha patología si este par de miARN diferencia dos cohortes de sujetos con un valor P estadísticamente significativo, y



(g) presentar todos o parte de los pares de miARN biomarcadores adecuados seleccionados en la etapa (f).

Los ejemplos no limitantes de los métodos que pueden usarse para medir el nivel de miARN en cualquiera de los métodos anteriores descritos en la presente descripción incluyen, por ejemplo, métodos basados en RT-PCR, métodos basados en matrices de miARN, secuenciación de nueva generación e hibridación.

Los ejemplos no limitantes de las muestras de fluidos corporales que pueden usarse en cualquiera de los métodos anteriores descritos en la presente descripción incluyen, por ejemplo, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (CSF), orina y saliva.

En cualquiera de los métodos anteriores descritos en la presente descripción, los sujetos pueden ser, por ejemplo, seres humanos o animales de experimentación.

En cualquiera de los métodos anteriores descritos en la presente descripción, se pueden comparar dos cohortes cualesquiera. Los ejemplos no limitantes de tales cohortes incluyen, por ejemplo, patología versus control [por ejemplo, sujetos sanos de la misma edad, género y etnia], una patología del órgano versus otra patología del mismo órgano, dos grupos de edad, [por ejemplo, 20-50 años versus 60-80 años], machos versus hembras [por ejemplo, de la misma edad y etnia], dos grupos étnicos o raciales diferentes [por ejemplo, de la misma edad y género], etc.).

El algoritmo de correlación de Spearman usado en los métodos descritos en la presente descripción:

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

en donde

$x_i$  son los valores del miARN numerador;

$y_i$  son los valores del miARN denominador;

$\bar{x}$  es la media de los valores del numerador, y

$\bar{y}$  es la media de los valores del denominador.

Puede calcularse un número mínimo de muestras suficiente para obtener una diferencia estadísticamente significativa entre dos cohortes en los métodos anteriores descritos en la presente descripción mediante una fórmula estándar para el estudio de casos y controles (véase, por ejemplo, Eng J. Radiology 2003, 227: 309-313).

En los métodos descritos en la presente descripción, se puede calcular un valor de P estadísticamente significativo mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales métodos son la prueba t de Student (para muestras con distribución normal) y la prueba de Mann-Whitney (para muestras con distribución no aleatoria) (Mann y Whitney, Annals Math Stat. 1947, 18: 50-60). El valor de P >0,05 usualmente se acepta como estadísticamente significativo. Si se prueban numerosos biomarcadores potenciales, se puede aplicar la corrección de Bonferroni.

### **Métodos de Diagnóstico, Monitoreo y Detección de la Invención**

La presente invención proporciona nuevos métodos altamente sensibles y no invasivos o mínimamente invasivos para diagnosticar y monitorear la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto, dichos métodos que comprenden determinar la relación de los niveles en una muestra de fluido corporal del sujeto (por ejemplo, plasma sanguíneo, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (CSF), saliva) de dos o más miARN específicos.

El uso de pares de miARN específicos en los métodos de diagnóstico de la invención permite una sensibilidad y confiabilidad muy altas y hace posible el diagnóstico temprano de la PD y distinguirla de otras enfermedades y afecciones neurodegenerativas (por ejemplo, Deterioro Cognitivo Leve (MCI) y enfermedad de Alzheimer (AD)). Este enfoque también proporciona información detallada y completa para monitorear el desarrollo de la PD y la efectividad del tratamiento, ya que se pueden detectar y cuantificar varios eventos específicos en neuronas (por ejemplo, cambios en el perfil de miARN, su secreción, degradación de neuritas, pérdida de sinapsis y finalmente muerte neuronal).

Los ejemplos no limitantes de pares de miARN útiles en los métodos descritos en la presente descripción incluyen, por ejemplo:

#### **Pares de miARN para detectar la PD**

**Enriquecidos en el cerebro:**

5 let-7e/miR-335, miR-107/miR-335, miR-491-5p/miR-335, miR-744/miR-335, miR-99b/miR-335, let-7e/miR-9\*, miR-491-5p/miR-9\*, let-7e/miR-132, miR-107/miR-132, miR-491-5p/miR-132, let-7e/miR-134, miR-107/miR-134, miR-99b/miR-134, miR-491-5p/miR-134, let-7e/miR-323-3p, miR-107/miR-323-3p, miR-127/miR-323-3p, miR-181b/miR-323-3p, miR-99b/miR-323-3p, miR-491-5p/miR-323-3p, let-7e/miR-411, miR-107/miR-411, miR-491-5p/miR-411.

**Inflamatorios:**

10 miR-155/miR-335, let-7e/miR-146b, miR-491-5p/miR-146a, let-7e/miR-146a, miR-744/miR-146a, miR-155/miR-16, miR-155/miR-132, miR-155/miR-323-3p, miR-155/miR-411, miR-491-5p/miR-146b, miR-155/miR-146a, miR-155/miR-146b.

**Pares de miARN para diferenciar PD y MCI**

15 **Enriquecidos en el cerebro:**

20 let-7e/miR-335, let-7e/miR-9\*, miR-107/miR-335, miR-127/miR-323-3p, miR-491-5p/miR-335, miR-491-5p/miR-9\*, miR-107/miR-9\*, miR-744/miR-335, let-7e/miR-132, miR-107/miR-134, miR-181b/miR-132, let-7e/miR-210, miR-181b/miR-9\*, miR-181a/miR-335, miR-491-5p/miR-134, let-7e/miR-874, miR-181b/miR-874, miR-107/miR-132, miR-491-5p/miR-132, miR-107/miR-323-3p, miR-127/miR-134, miR-491-5p/miR-874, miR-491-5p/miR-323-3p, miR-127/miR-432, let-7e/miR-134, let-7e/miR-411, miR-107/miR-411, miR-491-5p/miR-411, miR-107/miR-874, miR-181a/miR-9\*, miR-491-5p/miR-210, miR-181b/miR-335, miR-99b/miR-335, miR-107/miR-210, miR-127/487b, miR-181a/miR-874, miR-9/miR-9\*, miR-107/miR-487b, miR-107/miR-432, miR-9/miR-335, miR-181a/miR-132, miR-181b/miR-210, miR-99b/miR-132.

**Inflamatorios:**

30 let-7e/miR-146a, miR-107/miR-146a, miR-491-5p/miR-146a, miR-107/miR-146b, miR-491-5p/miR-146b, miR-155/miR-874, let-7e/miR-146b, miR-155/miR-9\*, miR-155/miR-335, miR-155/miR-411, miR-744/miR-146a.

**Pares de miARN para diferenciar PD y AD**

35 **Enriquecidos en el cerebro:**

40 let-7e/miR-335, miR-107/miR-335, miR-127/miR-323-3p, let-7e/miR-411, miR-99b/miR-335, miR-491-5p/miR-335, miR-127/miR-134, miR-744/miR-335, miR-9/miR-335, miR-181b/miR-335, miR-107/miR-411, miR-181a/miR-335, let-7e/miR-9\*, miR-491-5p/miR-411, let-7e/miR-132, miR-181b/miR-132, miR-9/miR-9\*, miR-9/miR-134, miR-107/miR-134, miR-181b/miR-874, let-7e/miR-134, miR-107/miR-132, miR-107/miR-9\*, miR-127/miR-335, miR-9/miR-132, miR-181b/miR-9\*, miR-491-5p/miR-132, let-7e/miR-210, miR-491-5p/miR-9\*, miR-107/miR-323-3p, miR-491-5p/miR-323-3p, miR-491-5p/miR-134, let-7e/miR-874, miR-181b/miR-210, miR-9/miR-874, miR-9/miR-485-3p, miR-744/miR-134, miR-181b/miR-323-3p.

**Inflamatorios:**

45 miR-107/miR-146a, miR-491-5p/miR-146a, miR-155/miR-132, miR-155/miR-335, miR-107/miR-146b, miR-491-5p/miR-146b, miR-9/miR-146a, let-7e/miR-146b, miR-9/miR-146b, let-7e/miR-146a, miR-155/miR-874, miR-155/miR-9\*, miR-744/miR-146a, miR-155/miR-210, miR-155/miR-146b, miR-744/miR-146b, miR-155/miR-146a, miR-155/miR-134, miR-155/miR-411, miR-181b/miR-146b.

50 En un aspecto, la descripción proporciona un método para detectar una primera enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, cuyo método comprende:

55 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa;

60 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no se ve afectada por la primera enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la primera enfermedad neurodegenerativa;

65 c) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (a) y (b);

d) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e

5 e) (i) identificar al sujeto como afectado por la primera enfermedad neurodegenerativa cuando la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la primera enfermedad neurodegenerativa cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la relación de control correspondiente.

10 En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para detectar una primera enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, cuyo método comprende:

15 a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa o (ii) es un miARN asociado a inflamación;

b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN (i) es un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o (ii) es un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

20 c) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (a) y (b);

d) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e

25 e) (i) identificar al sujeto como afectado por la primera enfermedad neurodegenerativa cuando la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la primera enfermedad neurodegenerativa cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la relación de control correspondiente.

30 En una modalidad de los dos métodos anteriores, el método comprende además refinar el diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y/o con las etapas (d)-(e) de los dos métodos anteriores:

35 f) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c) con el intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de una segunda enfermedad neurodegenerativa, y

40 g) (i) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) no cae dentro del intervalo estándar de las relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) no excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.

45 En una modalidad de los dos métodos anteriores, el método comprende además refinar el diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y/o con las etapas (a)-(e) de los dos métodos anteriores:

50 f) medir el nivel de un tercer miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho tercer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por una segunda enfermedad neurodegenerativa;

55 g) medir el nivel de un cuarto miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho cuarto miARN enriquecido en el cerebro está (i) enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectada por la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el tercer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del tercer miARN durante el desarrollo de la segunda enfermedad neurodegenerativa;

h) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (f) y (g);

60 i) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) con el intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa;

65 j) (i) identificar al sujeto como afectado por la segunda enfermedad neurodegenerativa además de la primera enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los

miARN calculada en la etapa (h) no cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.

5 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores, dicha primera enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson (PD).

10 En una modalidad de los métodos anteriores de diferenciación de enfermedades, dicha primera enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Parkinson (PD) y dicha segunda enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer (AD), Deterioro Cognitivo Leve (MCI), enfermedad de Huntington (HD), enfermedades causadas por priones, demencia frontotemporal (FTD), demencia con cuerpos de Lewy, demencias vasculares, Esclerosis Tardía Amiotrófica (ALS), encefalopatía traumática crónica (CTE), parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (MSA), degeneración corticobasal (CB- GD), enfermedad de Pick y atrofia olivopontocerebelosa (OPCA).

15 En un aspecto, la descripción proporciona un método para detectar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto, cuyo método comprende:

20 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro es miARN neuronal enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal;

25 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro está (i) enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la PD, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la PD, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambian de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la PD;

c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

30 d) comparar la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e

35 e) (i) identificar al sujeto como afectado por la PD cuando la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la PD cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es más alta que la relación de control correspondiente.

40 En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para detectar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto, cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN es (i) un miARN neuronal enriquecido en el cerebro enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal o es (ii) un miARN asociado a inflamación;

45 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN es (i) un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o es (ii) un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

50 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

d) comparar la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e

55 e) (i) identificar al sujeto como afectado por la PD cuando la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la PD cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es más alta que la relación de control correspondiente.

60 En una modalidad de los dos métodos anteriores para detectar la PD, el método comprende además refinar el diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y con las etapas (d)-(e) de los dos métodos anteriores para detectar la PD:

f) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) con el intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de una segunda enfermedad neurodegenerativa diferente de la PD;

65 g) (i) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles

de los miARN calculada en la etapa (c) no cae dentro del intervalo estándar de las relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) no excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.

5 En una modalidad de los dos métodos anteriores para detectar la PD, el método comprende además refinar el diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y con las etapas (s)-(e) de los dos métodos anteriores para detectar la PD:

10 f) medir el nivel de un tercer miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho tercer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por una segunda enfermedad neurodegenerativa y es un numerador preidentificado en un par de miARN de biomarcador para dicha segunda enfermedad neurodegenerativa;

15 g) medir el nivel de un cuarto miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho cuarto miARN enriquecido en el cerebro es y es un denominador preidentificado en el par de miARN biomarcador para dicha segunda enfermedad neurodegenerativa y está (i) enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no se ve afectada(s) por la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no se ve afectada por la segunda enfermedad neurodegenerativa y es diferente del tipo de célula donde se encuentra el tercer miARN enriquecido, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el tercer miARN, pero su expresión y/o secreción cambian de manera diferente a la expresión y/o secreción del tercer miARN durante el desarrollo de la segunda enfermedad neurodegenerativa;

25 h) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (f) y (g);

i) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) con el intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa;

30 j) (i) identificar al sujeto como afectado por la segunda enfermedad neurodegenerativa además de la PD si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (h) no cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.

35 En una modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de detección de enfermedades, la relación de control es un valor predeterminado que representa una relación umbral validada estadísticamente de los niveles de dicho primer y segundo miARN (un único valor de "corte") igual al valor más alto posible dentro del intervalo de valores correspondientes en sujetos sanos de la misma edad (por ejemplo,  $\pm 2,5$  años). Tal umbral validado estadísticamente (valor de "corte") puede establecerse mediante el análisis de una gran cohorte de individuos sanos en la población seleccionada de la misma edad y usarse un modelo estadístico adecuado (ver, por ejemplo, Knapp, RG y Miller, ME (1992) *Clinical Epidemiology and Biostatistics*, William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa.). En otra modalidad de cualquiera de los métodos anteriores de detección de enfermedades, la relación de control es la relación de los niveles de dicho primer y segundo miARN en una muestra de fluido corporal procesada de manera similar a la del mismo sujeto recolectada en el pasado.

40 Dado que los procesos patológicos característicos de diversas enfermedades neurodegenerativas a menudo se observan en el cerebro de un mismo paciente (Hu WT y otros, *Acta Neuropathol.* 2010; 120: 385-399; Farlow MR y otros, *Dement. Geriatr. Cogn. Disord. Extra* 2013; 3: 281-290; Stern RA y otros, 2011; 3: S460-S467; Costanza A. y otros, *Neuropathol.* 2011; 37: 570-584), la presente descripción también proporciona métodos para el diagnóstico diferencial, que pueden involucrar el uso de dos o más pares biomarcadores diferentes y excluye la presencia de una patología adicional o demuestra la presencia simultánea de tal patología adicional (es decir, patología mixta).

55 En los métodos de diagnóstico de la invención, con el fin de refinar aún más el diagnóstico y diferenciar entre la PD y otras enfermedades neurodegenerativas (tal como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (AD), el Deterioro Cognitivo Leve (MCI), la enfermedad de Huntington (HD), enfermedades causadas por priones, demencia frontotemporal (FTD), demencia con cuerpos de Lewy, demencias vasculares, Esclerosis Tardía Amiotrófica (ALS), Encefalopatía Traumática Crónica (CTE), parálisis supranuclear progresiva (PSP), atrofia multisistémica (MSA), degeneración corticobasal (CBGD), enfermedad de Pick y atrofia olivopontocerebelosa (OPCA)) la relación de los niveles de los miARN dentro del par biomarcador en la muestra del sujeto se compara con el intervalo estándar de relaciones de los niveles de los mismos miARN encontrados en sujetos (preferentemente de la misma edad por ejemplo,  $\pm 2,5$  años) que tienen PD o una enfermedad neurodegenerativa diferente. Tal comparación de "refinamiento" se puede realizar después del diagnóstico inicial (es decir, comparación con un umbral de control saludable) o simultáneamente con tal diagnóstico inicial. Tal comparación de "refinamiento" se puede realizar simultáneamente para varias enfermedades diferentes o secuencialmente. El intervalo estándar de relaciones específicas de la enfermedad que se usa en la comparación de "refinamiento" es usualmente un intervalo predeterminado validado

estadísticamente que puede establecerse mediante el análisis de una gran cohorte de individuos diagnosticados con una enfermedad neurodegenerativa específica en la población seleccionada (preferentemente de la misma edad por ejemplo,  $\pm 2,5$  años) y el uso de un modelo estadístico. Se puede realizar un "refinamiento" adicional para determinar no solo la enfermedad específica, sino también el grado de progresión de tal enfermedad, mediante el uso de intervalos de relaciones estándar específicos de la etapa de la enfermedad para la comparación (dichos intervalos estándar se establecen mediante el análisis de una gran cohorte de individuos diagnosticados con un etapa específica de una enfermedad neurodegenerativa específica).

En otro aspecto, la descripción proporciona un método para monitorear cambios en el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que ha sido diagnosticado previamente con dicha enfermedad neurodegenerativa), cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en dos o más muestras de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa;

b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en las mismas muestras de fluidos corporales que en la etapa (a), en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectada por la enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa;

c) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (a) y (b) para cada muestra de fluido corporal;

d) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (c) entre la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) anteriormente y las recolectadas posteriormente, y

e) (i) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) aumenta en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente, o (ii) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto no ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no cambia en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente.

En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para monitorear cambios en el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que ha sido diagnosticado previamente con dicha enfermedad neurodegenerativa), cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN en dos o más muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto, en donde dicho primer miARN (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa o (ii) es un miARN asociado a inflamación;

b) medir el nivel de un segundo miARN en las mismas muestras de fluidos corporales que en la etapa (a), en donde dicho segundo miARN (i) es un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o (ii) es un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

c) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (a) y (b) para cada muestra de fluido corporal;

d) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (c) entre la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) anteriormente y las recolectadas posteriormente, y

e) (i) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) aumenta en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente, o (ii) determinar que la enfermedad neurodegenerativa en el sujeto no ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no cambia en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente.

En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para monitorear cambios en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que había sido diagnosticado previamente con PD), cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en dos o más muestras de fluido corporal

recolectadas del sujeto, en donde las muestras se han recolectado en puntos de tiempo espaciados, y en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en el mesencéfalo y/o frontal corteza;

b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en las mismas muestras de fluido corporal que en la etapa (a), en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro está (i) enriquecido en áreas del cerebro que no están afectadas por la PD, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la PD, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN enriquecido en el cerebro, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN enriquecido en el cerebro durante el desarrollo de la PD;

c) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (a) y (b) para cada muestra de fluido corporal;

d) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (c) entre la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) anteriormente y las recolectadas posteriormente, y

e) (i) determinar que la PD en el sujeto ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) aumenta en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente, o (ii) determinar que la PD en el sujeto no ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no cambia en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente.

En otro aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para monitorear cambios en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto (por ejemplo, un sujeto que había sido diagnosticado previamente con PD), cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN en dos o más muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto, en donde las muestras se han recolectado en puntos de tiempo espaciados, y en donde dicho primer miARN es (i) un miARN neuronal enriquecido en el cerebro enriquecido en el mesencéfalo y/o corteza frontal o es (ii) un miARN asociado a inflamación;

b) medir el nivel de un segundo miARN en las mismas muestras de fluido corporal que en la etapa (a), en donde dicho segundo miARN es (i) un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o es (ii) un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

c) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (a) y (b) para cada muestra de fluido corporal;

d) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (c) entre la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) anteriormente y las recolectadas posteriormente, y

e) (i) determinar que la PD en el sujeto ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) aumenta en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente, o (ii) determinar que la PD en el sujeto no ha progresado si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no cambia en la(s) muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) posteriormente en comparación con la(s) muestra(s) recolectada(s) anteriormente.

En un aspecto separado, la descripción proporciona método para monitorear el efecto de un tratamiento sobre el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto al que previamente se le había diagnosticado dicha enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto antes del inicio del tratamiento, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa;

b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa;

c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) del sujeto en el curso de o después del tratamiento;

- e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- 5 f) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada muestra de fluido corporal;
- g) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en las etapas (c) y (f) y, opcionalmente, comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (f) entre diferentes muestras en la etapa (d), y
- 10 h) (i) determinar que el tratamiento es efectivo para dicha enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f), o (ii) determinar que el tratamiento no es efectivo para dicha enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f).
- 15 En un aspecto relacionado, la descripción proporciona método para monitorear el efecto de un tratamiento sobre el desarrollo de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto al que previamente se le había diagnosticado dicha enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende:
- 20 a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto antes del inicio del tratamiento, en donde dicho primer miARN (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa o (ii) es un miARN asociado a inflamación;
- 25 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN (i) es un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o (ii) es un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;
- c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- 30 d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) del sujeto en el curso de o después del tratamiento;
- e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- 35 f) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada muestra de fluido corporal;
- g) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en las etapas (c) y (f) y, opcionalmente, comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (f) entre diferentes muestras en la etapa (d), y
- 40 h) (i) determinar que el tratamiento es efectivo para dicha enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f), o (ii) determinar que el tratamiento no es efectivo para dicha enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f).
- 45 En otro aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para monitorear el efecto de un tratamiento sobre el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto que había sido previamente diagnosticado con PD, cuyo método comprende:
- 50 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto antes del inicio del tratamiento, en donde dicho primer miARN está enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal;
- 55 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN está (i) enriquecido en áreas del cerebro que no están afectadas por la PD, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la PD, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la PD;
- 60 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) del sujeto en el curso de o después del tratamiento;
- 65



- e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- 5 f) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada muestra de fluido corporal;
- g) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en las etapas (c) y (f) y, opcionalmente, comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (f) entre diferentes muestras en la etapa (d), y
- 10 h) (i) determinar que el tratamiento para la PD es efectivo si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f), o (ii) determinar que el tratamiento para la PD no es efectivo si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f).
- 15 En aún otro aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para monitorear el efecto de un tratamiento sobre el desarrollo de la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto que había sido previamente diagnosticado con PD, cuyo método comprende:
- 20 a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal recolectada del sujeto antes del inicio del tratamiento, en donde dicho primer miARN es (i) un miARN neuronal enriquecido en el cerebro enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal o es (ii) un miARN asociado a inflamación;
- 25 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN es (i) un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o es (ii) un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;
- c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- 30 d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestra(s) de fluido corporal recolectada(s) del sujeto en el curso de o después del tratamiento;
- e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- 35 f) calcular la relación de los niveles de miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada muestra de fluido corporal;
- g) comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en las etapas (c) y (f) y, opcionalmente, comparar las relaciones de los niveles de miARN calculadas en la etapa (f) entre diferentes muestras en la etapa (d), y
- 40 h) (i) determinar que el tratamiento para la PD es efectivo si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f), o (ii) determinar que el tratamiento para la PD no es efectivo si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la(s) relación(ones) correspondiente(s) calculada(s) en la etapa (f).
- 45 En un aspecto separado, la descripción proporciona un método para identificar un compuesto útil para enlentecer la progresión o tratar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto al que previamente se le había diagnosticado dicha enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende:
- 50 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal, en donde dicha(s) muestra(s) de fluido corporal se recolecta(n) del sujeto antes de la administración del compuesto de prueba, y en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa;
- 55 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN enriquecido en el cerebro (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro que no está(n) afectada(s) por la enfermedad neurodegenerativa, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la enfermedad neurodegenerativa, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la enfermedad neurodegenerativa;
- 60 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestras de fluido corporal recolectada(s) del sujeto después de la administración de un compuesto de prueba;
- 65

- e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- 5 f) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto después de la administración del compuesto de prueba;
- g) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en las etapas (c) y (f), y
- 10 h) (i) identificar que el compuesto de prueba es útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (f) es menor que la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto de prueba no es útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (f) no es menor que la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c).
- 15 En un aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para identificar un compuesto útil para enlentecer la progresión o tratar una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto al que previamente se le había diagnosticado dicha enfermedad neurodegenerativa, cuyo método comprende:
- 20 a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal, en donde dicha(s) muestra(s) de fluido corporal se recolecta(n) del sujeto antes de la administración del compuesto de prueba, y en donde dicho primer miARN (i) está enriquecido en un(as) área(s) del cerebro afectada(s) por la primera enfermedad neurodegenerativa o (ii) es un miARN asociado a inflamación;
- 25 b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN (i) es un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o (ii) es un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;
- c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- 30 d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestras de fluido corporal recolectada(s) del sujeto después de la administración de un compuesto de prueba;
- e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);
- 35 f) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto después de la administración del compuesto de prueba;
- g) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en las etapas (c) y (f), y
- 40 h) (i) identificar que el compuesto de prueba es útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (f) es menor que la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto de prueba no es útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (f) no es menor que la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c).
- 45 En otro aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para identificar un compuesto útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto que había sido diagnosticado previamente con PD, cuyo método comprende:
- 50 a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de fluido corporal, en donde dicha(s) muestra(s) de fluido corporal se recolecta del sujeto antes de la administración del compuesto de prueba, y en donde dicho primer miARN está enriquecido en el mesencéfalo y/o la corteza frontal;
- 55 b) medir el nivel de un segundo miARN enriquecido en el cerebro en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN está (i) enriquecido en áreas del cerebro que no están afectadas por la PD, o (ii) está enriquecido en un tipo de célula cerebral que no está afectado por la PD, o (iii) está enriquecido en la misma área del cerebro que el primer miARN, pero su expresión y/o secreción cambia de manera diferente a la expresión y/o secreción del primer miARN durante el desarrollo de la PD;
- 60 c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
- d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestras de fluido corporal recolectada(s) del sujeto después de la administración de un compuesto de prueba;
- 65 e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal

que en la etapa (d);

f) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto después de la administración del compuesto de prueba;

g) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en las etapas (c) y (f), y

h) (i) identificar que el compuesto de prueba es útil para enlentecer la progresión o tratar la PD si la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (f) es menor que la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto de prueba no es útil para enlentecer la progresión o tratar la PD si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (f) no es menor que la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c).

En aún otro aspecto relacionado, la descripción proporciona un método para identificar un compuesto útil para enlentecer la progresión o tratar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto que había sido diagnosticado previamente con PD, cuyo método comprende:

a) medir el nivel de un primer miARN en una muestra de fluido corporal, en donde dicha(s) muestra(s) de fluido corporal se recolectan del sujeto antes de la administración del compuesto de prueba, y en donde dicho primer miARN es (i) un miARN neuronal enriquecido en el cerebro enriquecido en el mesencéfalo y/o corteza frontal o es (ii) un miARN asociado a inflamación;

b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra de fluido corporal recolectada del sujeto, en donde dicho segundo miARN es (i) un miARN asociado a inflamación si el primer miARN es un miARN enriquecido en el cerebro o es (ii) un miARN enriquecido en el cerebro si el primer miARN es un miARN asociado a inflamación;

c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);

d) medir el nivel del mismo primer miARN que en la etapa (a) en una o más muestras de fluido corporal recolectada(s) del sujeto después de la administración de un compuesto de prueba;

e) medir el nivel del mismo segundo miARN que en la etapa (b) en la(s) misma(s) muestra(s) de fluido corporal que en la etapa (d);

f) calcular la relación de los niveles de los miARN medidos en las etapas (d) y (e) para cada una de las muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto después de la administración del compuesto de prueba;

g) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en las etapas (c) y (f), y

h) (i) identificar que el compuesto de prueba es útil para enlentecer la progresión o tratar la PD si la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (f) es menor que la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c); (ii) identificar que el compuesto de prueba no es útil para enlentecer la progresión o tratar la PD si la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (f) no es menor que la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c).

Los métodos de la presente invención se basan en la medición de los niveles de ciertos miARN en fluidos corporales. El uso de fluidos corporales que se pueden recolectar mediante técnicas no invasivas o mínimamente invasivas (por ejemplo, en oposición a la detección en el cerebro) permite un procedimiento de diagnóstico rentable y mínimamente invasivo o no invasivo. Los fluidos corporales preferidos para su uso en los métodos descritos en la presente descripción son plasma sanguíneo, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (CSF) y saliva. Sin embargo, también se puede usar cualquier otro fluido corporal.

Los ejemplos de métodos útiles para medir el nivel de miARN en fluidos corporales incluyen hibridación con sondas selectivas (por ejemplo, mediante el uso de transferencia Northern, citometría de flujo basada en perlas, microchip [micromatrcies]de oligonucleótidos o ensayos de hibridación en solución tal como el kit de detección de miARN Ambion mirVana), detección basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa [RT-PCR]de tallo-bucle, método de matriz cuantitativa basado en RT-PCR [matriz qPCR]), secuenciación directa mediante una de las tecnologías de secuenciación de nueva generación (por ejemplo, secuenciación de ARN pequeño de Helicos, miARN BeadArray (Illumina), Roche 454 (FLX-Titanium) y ABI SOLiD) o diversas tecnologías de microfluidos. Para una revisión de técnicas adicionales aplicables, ver, por ejemplo, Chen y otros, BMC Genomics, 2009, 10:407; Kong y otros, J Cell Physiol. 2009; 218:22-25. Uno de los tipos preferidos de técnicas son las técnicas basadas en RT-PCR, ya que tales técnicas permiten lograr una buena sensibilidad y especificidad.

En algunas modalidades, los miARN se purifican antes de la cuantificación. Los miARN se pueden aislar y purificar a partir de fluidos corporales mediante varios métodos, que incluyen el uso de kits comerciales (por ejemplo, kit

miRNeasy [Qiagen], kit de aislamiento de ARN MirVana [Ambion/ABI], miRACLE [Agilent], kit de aislamiento de miARN de alta pureza [Roche] y kit de purificación de miARN [Norgen Biotek Corp.], extracción con Trizol (ver Ejemplo 1, a continuación), concentración y purificación en intercambiadores de aniones, perlas magnéticas cubiertas por sustancias que se unen al ARN o adsorción de ciertos miARN en oligonucleótidos complementarios.

En algunas modalidades, se reduce o elimina la degradación de miARN en muestras de fluidos corporales y/o durante la purificación de miARN. Los métodos útiles para reducir o eliminar la degradación de miARN incluyen, sin limitación, añadir inhibidores de RNasa (por ejemplo, RNasin Plus [Promega], SUPERasa-In [ABI], etc.), uso de cloruro de guanidina, isotiocianato de guanidina, N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de sodio (SDS), o una combinación de los mismos. Reducir la degradación de miARN en muestras de fluido corporal es particularmente importante cuando se requiere el almacenamiento y transporte de la muestra antes de la cuantificación de miARN.

Para tener en cuenta las posibles pérdidas de un miARN dado durante la purificación, la inhibición potencial de la RT-PCR, los contaminantes de miARN derivados de las células sanguíneas o de la orina muertas o dañadas durante el aislamiento y el tratamiento de la muestra, las variaciones en la filtración renal, etc., se pueden emplear varios métodos adicionales de normalización de datos experimentales. Por ejemplo, los siguientes métodos de normalización y control de calidad (QC) se pueden usar en la presente descripción:

a) Se pueden usar miARN ubicuos para QC mediante la comparación de sus concentraciones en el plasma del sujeto con valores normales preestablecidos.

b) Los oligonucleótidos sintéticos de ARN pequeño (por ejemplo, miARN no humano) pueden sintetizarse y usarse como controles para las pérdidas durante la purificación y la inhibición de RT-PCR (añadiéndolos a muestras de fluido corporal antes de la purificación de ARN).

c) Para tener en cuenta las variaciones en la filtración renal (cuando se trabaja con muestras de orina), la concentración de miARN en la orina se puede normalizar con el nivel de creatinina y/o albúmina.

**Kits descritos en la presente descripción**

Junto con los métodos de diagnóstico, monitoreo y detección anteriores, la presente descripción proporciona varios kits que comprenden uno o más conjuntos de cebadores y/o sondas específicos para la detección de los pares de miARN de diagnóstico.

Los ejemplos no limitantes de los kits descritos en la presente descripción incluyen:

1. Un kit para la detección de PD que comprende cebadores y/o sondas específicos para uno o más pares de miARN seleccionados del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, miR-107/miR-335, miR-491-5p/miR-335, miR-744/miR-335, miR-99b/miR-335, let-7e/miR-9\*, miR-491-5p/miR-9\*, let-7e/miR-132, miR-107/miR-132, miR-491-5p/miR-132, let-7e/miR-134, miR-107/miR-134, miR-99b/miR-134, miR-491-5p/miR-134, let-7e/miR-323-3p, miR-107/miR-323-3p, miR-127/miR-323-3p, miR-181b/miR-323-3p, miR-99b/miR-323-3p, miR-491-5p/miR-323-3p, let-7e/miR-411, miR-107/miR-411, miR-491-5p/miR-411; miR-155/miR-335, let-7e/miR-146b, miR-491-5p/miR-146a, let-7e/miR-146a, miR-744/miR-146a, miR-155/miR-16, miR-155/miR-132, miR-155/miR-323-3p, miR-155/miR-411, miR-491-5p/miR-146b, miR-155/miR-146a, and miR-155/miR-146b.

2. Un kit para diferenciar la PD del MCI que comprende cebadores y/o sondas específicos para uno o más pares de miARN seleccionados del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, let-7e/miR-9\*, miR-107/miR-335, miR-127/miR-323-3p, miR-491-5p/miR-335, miR-491-5p/miR-9\*, miR-107/miR-9\*, miR-744/miR-335, let-7e/miR-132, miR-107/miR-134, miR-181b/miR-132, let-7e/miR-210, miR-181b/miR-9\*, miR-181a/miR-335, miR-491-5p/miR-134, let-7e/miR-874, miR-181b/miR-874, miR-107/miR-132, miR-491-5p/miR-132, miR-107/miR-323-3p, miR-127/miR-134, let-7e/miR-411, miR-107/miR-411, miR-491-5p/miR-874, miR-491-5p/miR-323-3p, miR-127/miR-432, let-7e/miR-134, let-7e/miR-411, miR-107/miR-411, miR-491-5p/miR-411, miR-107/miR-874, miR-181a/miR-9\*, miR-491-5p/miR-210, miR-181b/miR-335, miR-99b/miR-335, miR-107/miR-210, miR-127/487b, miR-181a/miR-874, miR-9/miR-9\*, miR-107/miR-487b, miR-107/miR-432, miR-9/miR-335, miR-181a/miR-132, miR-181b/miR-210, and miR-99b/miR-132; let-7e/miR-146a, miR-107/miR-146a, miR-491-5p/miR-146a, miR-107/miR-146b, miR-491-5p/miR-146b, miR-155/miR-874, let-7e/miR-146b, miR-155/miR-9\*, miR-155/miR-335, miR-155/miR-411, and miR-744/miR-146a.

3. Un kit para diferenciar la PD de la AD que comprende cebadores y/o sondas específicos para uno o más pares de miARN seleccionados del grupo que consiste en: let-7e/miR-335, miR-107/miR-335, miR-127/miR-323-3p, let-7e/miR-411, miR-99b/miR-335, miR-491-5p/miR-335, miR-127/miR-134, miR-744/miR-335, miR-9/miR-335, miR-181b/miR-335, miR-107/miR-411, miR-181a/miR-335, let-7e/miR-9\*, miR-491-5p/miR-411, let-7e/miR-132, miR-181b/miR-132, miR-9/miR-9\*, miR-9/miR-134, miR-107/miR-134, miR-181b/miR-874, let-7e/miR-134, miR-107/miR-132, miR-107/miR-9\*, miR-127/miR-335, miR-9/miR-132, miR-181b/miR-9\*, miR-491-5p/miR-132, let-7e/miR-210, miR-491-5p/miR-9\*, miR-107/miR-323-3p, miR-491-5p/miR-323-3p, miR-491-5p/miR-134, let-7e/miR-874, miR-181b/miR-210, miR-9/miR-874, miR-9/miR-485-3p, miR-744/miR-134, miR-181b/miR-323-3p; miR-107/miR-146a, miR-491-5p/miR-146a, miR-155/miR-132, miR-155/miR-335, miR-107/miR-146b, miR-491-5p/miR-146b, miR-9/miR-

146a, let-7e/miR-146b, miR-9/miR-146b, let-7e/miR-146a, miR-155/miR-874, miR-155/miR-9\*, miR-155/miR-411, miR-744/miR-146a, miR-155/miR-210, miR-155/miR-146b, miR-744/miR-146b, miR-155/miR-146a, miR-155/miR-134, and miR-181b/miR-146b.

5 4. Un kit que comprende cebadores y/o sondas específicos para una o más combinaciones de pares de miARN seleccionados del grupo que consiste en:

(a) miR-181b/miR-323-3p y miR-99b/miR-9\*,

10 (b) miR-491-5p/miR-487b y miR-9/miR-146a, y

(c) miR-491-5p/miR-210 y miR-181a/miR-146b.

15 Tales kits pueden incluir además conjuntos de cebadores y/o sondas específicos para la detección de miARN para QC y normalizadores adicionales.

Tales kits pueden ser útiles para la detección directa de miARN en muestras de fluido corporal aisladas de pacientes o pueden usarse en muestras de ARN purificado.

20 Un kit descrito en la presente descripción también puede proporcionar reactivos para reacciones de amplificación y extensión de cebadores. Por ejemplo, en algunas modalidades, el kit puede incluir además uno o más de los siguientes componentes: una enzima transcriptasa inversa, una enzima ADN polimerasa (tal como, por ejemplo, una ADN polimerasa termoestable), un tampón de reacción en cadena de la polimerasa, un tampón de transcripción inversa y desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP). Alternativamente (o además), un kit puede incluir reactivos para realizar un  
25 ensayo de hibridación. Los agentes detectores pueden incluir análogos de nucleótidos y/o un resto de marcaje, por ejemplo, un resto directamente detectable tal como un fluoróforo (fluorocromo) o un isótopo radiactivo, o un resto indirectamente detectable, tal como un miembro de un par de unión, tal como biotina, o una enzima capaz de catalizar una reacción colorimétrica o luminométrica no soluble. Además, el kit puede incluir además al menos un recipiente que contenga reactivos para la detección de ácidos nucleicos sometidos a electroforesis. Tales reactivos incluyen aquellos que detectan directamente ácidos nucleicos, tales como agentes intercalantes fluorescentes o reactivos de tinción con plata, o aquellos reactivos dirigidos a detectar ácidos nucleicos marcados, tales como, pero sin limitarse a, reactivos ECL. Un kit puede incluir además medios de purificación o aislamiento de miARN, así como también controles positivos y negativos. Un kit también puede incluir un aviso asociado al mismo en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de kits de diagnóstico. También se pueden  
35 proporcionar con el kit instrucciones detalladas de uso, almacenamiento y resolución de problemas. También se puede proporcionar opcionalmente un kit en una carcasa adecuada que sea preferentemente útil para la manipulación robótica en un entorno de alto rendimiento.

40 Los componentes del kit se pueden proporcionar como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también se pueda proporcionar en otro recipiente. El recipiente incluirá generalmente al menos un vial, tubo de prueba, matraz, botella, jeringa y/u otros medios del recipiente, en los que se coloca el disolvente, opcionalmente en alícuotas. Los kits también pueden comprender un segundo medio de recipiente para contener un tampón estéril, farmacéuticamente aceptable y/u otro disolvente.

45 Cuando haya más de un componente en el kit, el kit también generalmente contendrá un segundo, tercer u otro recipiente adicional en el que los componentes adicionales pueden colocarse por separado. Sin embargo, se pueden incluir varias combinaciones de componentes en un recipiente.

50 Tales kits también pueden incluir componentes que conservan o mantienen el ADN o el ARN, tales como reactivos que protegen contra la degradación del ácido nucleico. Tales componentes pueden estar libres de nucleasas o ARNasas o proteger contra ARNasas, por ejemplo. Cualquiera de las composiciones o reactivos descritos en la presente descripción pueden ser componentes de un kit.

## 55 EJEMPLOS

La presente invención también se describe y demuestra mediante los siguientes ejemplos. Sin embargo, el uso de estos y otros ejemplos en cualquier parte de la descripción es solo ilustrativo y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ejemplificado.

60

### Ejemplo 1: Selección de miARN para las pruebas

Los métodos de la presente invención se basan en el uso de miARN enriquecidos en diferentes áreas del cerebro como numeradores y denominadores, lo que mejora significativamente la sensibilidad y especificidad de la prueba. La  
65 Tabla 1 a continuación presenta listas de miARN enriquecidos en el cerebro, miARN enriquecidos en sinapsis, axones, dendritas y espinas ("miR-NA de sinapsis y/o neuritas") y miARN enriquecidos en diferentes áreas del cerebro.

**Tabla 1. miARN enriquecidos en cerebro, diferentes áreas del cerebro y compartimentos neuronales**

Áreas y compartimentos del cerebro	miARN enriquecidos
Todo el cerebro	Let-7a,c,e, 7, 9, 96, 98, 99a,b, 103, 105, 106a, 107, 124a, 125a, 125b, 127, 128a, 129, 132, 134, 135a, 137, 138, 139, 149, 151, 153, 154, 181a, 181b, 181c, 182, 183, 184, 190, 204, 211, 212, 213, 218, 219-3p, 219-5p, 221, 222, 299-3p, 299-5p, 323-3p, 324-5p, 326, 328, 329, 330, 331, 33 5, 337, 338-5p, 340, 342, 346, 369-3p, 369-5p, 370, 379, 381, 382, 383, 409-3p, 410, 411, 423-5p, 425, 432, 433-5p, 485-3p, 485-3p,-5p, 487a, b, 488, 491-5p, 494, 495, 496, 497, 504, 522, 539, 541, 543, 551b, 577, 584, 592, 598, 625, 628, 654, 655, 656, 671, 668, 672, 708, 744, 758, 769-3p,-5p, 770, 873, 874, 876-3p, 885-3p,-5p, 889, 935, 939, 941, 1193, 1197, 1224-3p,-5p, 1225-3p, 1237, let-7d*, 7*, 9*, 125b-2*, 129*, 138-2*, 340*, 380*, 411*, 425*, 488*, 744*
Sinapsis, axones, dendritas, espinas	Let-7e, 7, 98, 99, 124a, 125a, 125b, 127-3p, 128a, 132, 134, 135a, 137, 138, 154, 182, 183, 213, 218, 323-3p, 329, 337, 369-3p, 369-5p, 370, 381, 382, 409-3p, 425, 433-5p, 483-3p, 485-5p, 487b, 491-5p, 494, 495, 496, 541, 543, 656, 668, 874, 889, 935, 939, 9*, 181a-1*
Corteza	9, 107, 124a, 125a, 125b, 128a, 132, 134, 154, 181c, 212, 213, 222, 323, 330-3p, 338-5p, 342, 381, 382, 425, 433, 491-5p, 885
Hipocampo	9, 96, 99a, 103, 124a, 125b, 128a, 132, 134, 137, 138, 153, 181a,b,c, 184, 212, 218, 219, 221, 222, 324-5p, 328, 330, 331, 335-5p, 338, 369-3p, 379, 381, 382, 383, 411, 425, 433-5p, 485-5p, 488, 874
Hipotálamo	7, 124a, 125a, 128a, 132, 136, 138, 212, 338, 451
Cerebelo	9, 103, 124a, 125b, 128, 132, 134, 137, 138, 181a, 181b, 181c, 204, 212, 213, 218, 338, 381, 382, 425, 432, 489, 592, 874, 885
Amígdala	103, 134, 138, 182, 183, 222, 323-3p, 369, 381, 382
Médula espinal	218, 219, 338, 451, 486
Glándula pituitaria	7, 96, 132, 99a,b, 154, 182, 212, 213, 328, 329, 335, 369, 381, 411, 432, 433, 487b
Mesencéfalo, Sustancia negra	Let-7a,b,c,d,e, 9, 99a,b, 125a,b, 127-3p, 129-3p, 134, 149, 181a, 204, 329, 338, 340, 379, 383, 410, 425, 432, 433, 487a,b, 744, 9*, 99b*, 129*, 340*

Dado que los procesos neuroinflamatorios están involucrados en la patogénesis de la PD, también se probaron varios miARN asociados con el proceso inflamatorio (miR-146a,b, miR-155 y miR-31). También se analizó el miR-210 asociado con hipoxia en combinación con miARN enriquecidos en el cerebro, y se probó el miR-206 enriquecido en músculo para comprobar si los trastornos del movimiento característicos de la PD afectan su concentración en plasma. Finalmente, los miR-16 y miR-196a ubicuos, que prácticamente no se expresan en el cerebro, se probaron como denominador potencial.

Los miARN probados se seleccionaron inicialmente en base a los datos de la literatura sobre su enriquecimiento en los compartimentos cerebrales y su presencia en neuritas (es decir, axones y/o dendritas y/o espinas) y/o sinapsis (Hua y otros, BMC Genomics. 2009; 10: 214; Liang y otros, BMC Genomics. 2007; 8:166; Landgraf y otros, Cell. 2007; 129: 1401-1414; Lee y otros, RNA. 2008; 14: 35-42; Schratt y otros, Nature. 2006; 439: 283-289; Lugli y otros, J. Neurochem. 2008; 106: 650-661; Bicker y Schratt. J. Cell Mol. Med. 2008; 12: 1466-1476; Smalheiser y Lugli. Neuromolecular Med. 2009; 11: 133-140; Rajasethupathy. Neuron. 2009; 63: 714-716; Kye. RNA. 2007; 13: 1224-1234; Yu y otros, Exp. Cell Res. 2008; 314: 2618-2633; Cougot y otros, J. Neurosci. 2008; 28: 13793-13804; Kawahara. Brain Nerve. 2008; 60: 1437-1444; Schratt. Rev. Neurosci. 2009; 10: 842-849; Pichardo-Casas y otros, Brain Research. 2012; 1436: 20-33), así como también sobre su participación sugerida en procesos asociados a neuritas y sinapsis (Base de datos de miR-Ontology: <http://ferrolab.dmi.unict.it/miro/>). Dado que existen datos que indican la participación de procesos inflamatorios en el desarrollo de la PD y otras enfermedades neurodegenerativas, también se preseleccionaron varios miARN asociados a inflamación, así como también miR-210 asociados con hipoxia. Finalmente, los presentes inventores probaron miR-206 enriquecido en células musculares porque los trastornos del movimiento son característicos de la PD y varios miARN ubicuos como normalizadores potenciales. Luego, los presentes inventores analizaron la literatura para descubrir qué miARN son detectables en plasma. En el estudio se analizaron 32 miARN (Tabla 2).

Tabla 2. miARN usados en el estudio

miARN	Enriquecimiento en el cerebro	Enriquecido en	Presente en sinapsis	Comentarios
Let-7e	+	MB, PG, Cer	+	
miR-7	+	PG	+	
miR-9	+	FC, MB, Hip, Cer		
miR-9*	+	MB		
miR-16				Ubicuo
miR-31				Inflamatorio
miR-99b	+	MB		
miR-107	+	FC	+	
miR-127-3p	+	PG, MB, FC	+	
miR-132	+	PG, Hip	+	
miR-134	+	MB, Hip, PG	+	
miR-138	+	Hip, FC	+	
miR-146a				Inflamatorio
miR-146b				Inflamatorio
miR-155				Inflamatorio
miR-181a	+	MB, FC, Hip	+	
miR-181b	+	FC, Hip,		
miR-196				Bajo en el cerebro
miR-206				Enriquecido en músculos
miR-210				Activado por hipoxia
miR-323-3p	+	FC, MB	+	
miR-335-5p	+	PG, Hip		
miR-370	+	PG, FC	+	
miR-411	+	PG, FC, Hip	+	
miR-432	+	MB, PG		
miR-451				
miR-485-3p	+	Hip	+	
miR-487b	+	PG, MB, FC	+	
miR-491-5p	+	MB, FC		
miR-744	+	MB	+	
miR-874	+	Cer, Hip	+	

Cer - Cerebelo; FC - Corteza Frontal; Hip - Hipocampo; MB - Mesencéfalo; PG - Glándula Pituitaria

**Ejemplo 2: Análisis Cuantitativo**

Se usó la prueba U de Mann-Whitney para evaluar la importancia de la diferenciación de dos grupos de pacientes cualesquiera mediante varios pares de miARN biomarcadores. Se aplicó la corrección de Bonferroni para estimar los valores P significativos. En todos los experimentos (diferenciación de la PD del control de la misma edad [AMC], MCI y AD) se probaron 32 miARN, por lo tanto, el valor  $P < 0,0001$  (calculado como  $0,05/496$ ; 496 aquí indica el número

total de pares de miARN examinados) se consideró significativo. Se aplicó una fórmula estándar para un estudio de casos y controles (Eng J. Radiology. 2003; 227:309-313) para estimar el tamaño de muestra requerido para producir una potencia estadística de 0,90.

**5 Ejemplo 3: Diferenciación de los pacientes con PD de los controles de la misma edad (AMC)**

Se obtuvieron muestras de plasma de 20 pacientes con PD y 20 con AMC ( $\pm 2,5$  años). Las concentraciones de miARN enriquecidos en el cerebro, miARN asociados a inflamación, miR-206 enriquecido en músculo y varios miARN ubicuos en plasma se analizaron mediante el uso de RT-qPCR con cebadores y sondas para cada miARN individual (Life Technologies). La cantidad de ARN equivalente a 25  $\mu$ l de plasma se tomaron en cada reacción de RT, y la cantidad de miARN (ADNc) equivalente a 2  $\mu$ l de plasma se tomó en la PCR final. Los resultados obtenidos para cada miARN se normalizaron por miARN normalizador potencial, convertidos en Concentración Relativa (RC) de miARN de acuerdo con el protocolo ABI ( $2^{-\Delta Ct}$ ), y se comparó con los perfiles de miARN de controles de la misma edad (AMC). Los pares biomarcadores se seleccionaron como se describió anteriormente. Ambos enfoques dieron resultados similares. La correlación de las concentraciones en plasma, los valores de P para la diferenciación de los pacientes con PD de los AMC y el AUC (área bajo la curva ROC) para los mejores pares de miARN se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 1.

**Tabla 3. Pares de miARN biomarcadores para diferenciar a los pacientes con PD de los AMC**

Marcador	R	Marcador	R
let-7e / miR-335	0,95	let-7e / miR-9*	0,97
miR-107 / miR-335	0,91	miR-491-5p / miR-9*	0,95
miR-491-5p / miR-335	0,93	Let-7e / miR-323-3p	0,85
miR-744 / miR-335	0,98	miR-107 / miR-323-3p	0,84
miR-99b / miR-335	0,91	miR-127 / miR-323-3p	0,84
miR-155 / miR-335	0,93	miR-181b / miR-323-3p	0,89
let-7e / miR-411	0,89	miR-99b / miR-323-3p	0,90
miR-107 / miR-411	0,90	miR-155 / miR-323-3p	0,83
miR-491-5p / miR-411	0,89	miR-491-5p / miR-323-3p	0,84
miR-155 / miR-411	0,93	let-7e / miR-146a	0,97
let-7e / miR-132	0,94	let-7e / miR-146b	0,96
miR-107 / miR-132	0,95	miR-491-5p / miR-146a	0,97
miR-491-5p / miR-132	0,94	miR-491-5p / miR-146b	0,97
miR-155 / miR-132	0,92	miR-744 / miR-146a	0,98
Let-7e / miR-134	0,92	miR-155 / miR-146a	0,96
miR-107 / miR-134	0,94	miR-155 / miR-146b	0,97
miR-491-5p / miR-134	0,91	miR-155 / miR-16	0,95
R - Coeficiente de correlación para miARN numerador y denominador; La Tabla muestra los pares de miARN con P<0,0001.			

**Conclusiones:**

- Los miARN enriquecidos en el mesencéfalo (por ejemplo, let-7e) y la corteza frontal (por ejemplo, miR-107), las áreas del cerebro que padecen la PD, y presentes en neuritas y sinapsis, son los mejores numeradores en pares de miARN, lo que demuestra el aumento en la relación de miARN de pacientes con PD en comparación con AMC. Aunque los inventores no pudieron identificar en la bibliografía datos sobre el enriquecimiento de miR-491-5p en áreas particulares del cerebro, se comporta como un muy buen numerador en pares de miARN, distinguiendo sujetos con PD y MCI.
- Los miARN enriquecidos en el cerebro de áreas del cerebro no involucradas en la PD o significativamente menos dañadas se encuentran entre los mejores denominadores en los pares de miARN capaces de diferenciar la PD y AMC (por ejemplo, miR-132 y miR-335-5p, enriquecidos en el hipocampo).



3. Los miARN asociados a inflamación se dividen en dos grupos. miR-155 y en menor grado miR-31 son buenos numeradores y miR-146a y miR-146b son buenos denominadores, lo que indica que juegan un papel diferente en el desarrollo de la PD o están ubicados en diferentes tipos de células.

5 4. El miR-206 enriquecido en músculo no es un buen marcador para la detección de la PD.

**Ejemplo 4: Diferenciación entre pacientes con PD y MCI**

10 El esquema de experimentos fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 2 anterior, pero los pacientes con PD se compararon con pacientes con MCI para descubrir pares de miARN biomarcadores capaces de diferenciar la PD de MCI, que es un síndrome heterogéneo, característico de las etapas tempranas de la AD, demencia frontotemporal, demencia vascular, algunos casos de PD y otras enfermedades neurodegenerativas. Los datos sobre la capacidad de varios pares de miARN para diferenciar a los pacientes con PD y MCI se presentan en la Figura 2 y la Tabla 4. Los resultados presentados demuestran que principalmente los mismos pares de miARN que distinguen PD de AMC diferencian PD de MCI.

**Tabla 4. Pares de miARN biomarcadores para diferenciar pacientes con PD y pacientes con MCI**

	<b>Marcador</b>	<b>R</b>	<b>Marcador</b>	<b>R</b>
20	let-7e / miR-146a	0,97	miR-491-5p / miR-	0,94
	let-7e / miR-335	0,95	miR-107 / miR-323-	0,84
	let-7e / miR-9*	0,97	miR-127 / miR-134	0,96
25	miR-107 / miR-	0,99	miR-155 / miR-335	0,93
	miR-107 / miR-335	0,91	miR-491-5p / miR-	0,85
	miR-127 / miR-	0,95	miR-491-5p / miR-	0,84
30	miR-491-5p / miR-	0,97	miR-127 / miR-432	0,99
	miR-491-5p / miR-	0,93	let-7e / miR-134	0,92
	miR-491-5p / miR-	0,95	miR-107 / miR-874	0,81
35	miR-107 / miR-	0,97	miR-181a / miR-9*	0,89
	miR-107 / miR-9*	0,97	miR-491-5p / miR-	0,95
	miR-744 / miR-335	0,93	miR-181b / miR-335	0,89
40	miR-491-5p / miR-	0,97	miR-99b / miR-335	0,91
	miR-155 / miR-874	0,88	miR-107 / miR-210	0,93
	let-7e / miR-132	0,94	miR-127 / miR-487b	0,94
45	miR-107 / miR-134	0,94	miR-181a / miR-874	0,87
	miR-181b / miR-	0,93	miR-744 / miR-146a	0,98
	let-7e / miR-210	0,94	miR-9 / miR-9*	0,98
50	Let-7e / miR-411	0,89	miR-155 / miR-210	0,94
	miR-107/miR-411	0,90	miR-99b / miR-9*	0,97
	miR-491-5p / miR-	0,89	miR-107 / miR-487b	0,92
55	let-7e / miR-874	0,85	miR-107 / miR-432	0,91
	miR-181b / miR-	0,87	miR-9 / miR-335	0,94
	let-7e / miR-146b	0,97	miR-181a/miR-132	0,89
60	miR-107 / miR-132	0,95	miR-181b / miR-210	0,91
	miR-155 / miR-411	0,93	miR-99b / miR-132	0,95
65	R - Coeficiente de correlación para miARN numerador y denominador; La Tabla muestra los pares de miARN con P<0,0001.			

**Ejemplo 5: Diferenciación entre pacientes con PD y con AD**

Nuevamente, el esquema de experimentos fue el mismo que el descrito en el Ejemplo 2 anterior, pero los pacientes con PD se compararon con pacientes con AD para descubrir pares de miARN biomarcadores capaces de diferenciar estas dos enfermedades neurodegenerativas. Los datos sobre la capacidad de diferentes pares de miARN para diferenciar a los pacientes con PD y AD se presentan en la Figura 3 y la Tabla 5. Los resultados presentados nuevamente demuestran que principalmente los mismos pares de miARN que distinguen PD de AMC y MCI diferencian la PD de AD. Curiosamente, en los dos últimos casos (diferenciación de PD de AD y MCI) miR-210 asociado con la hipoxia se comporta como un buen denominador.

**Tabla 5. Pares de miARN biomarcadores para diferenciar pacientes con PD y pacientes con AD**

Marcador	R	Marcador	R
let-7e / miR-335	0,95	miR-9 / miR-9*	0,98
miR-107 / miR-146a	0,99	miR-9 / miR-134	0,9
miR-107 / miR-335	0,91	miR-107 / miR-134	0,94
miR-127 / miR-323-3p	0,95	miR-181b / miR-874	0,87
miR-107 / miR-411	0,90	let-7e / miR-134	0,92
miR-99b / miR-335	0,91	miR-107 / miR-132	0,95
miR-491-5p / miR-146a	0,97	miR-107 / miR-9*	0,97
miR-491-5p / miR-335	0,93	miR-155 / miR-146b	0,97
miR-127 / miR-134	0,96	miR-127 / miR-335	0,84
miR-155 / miR-132	0,92	miR-9 / miR-132	0,93
miR-155 / miR-335	0,93	miR-744 / miR-146b	0,94
miR-744 / miR-335	0,93	miR-181b / miR-9*	0,94
miR-9 / miR-335	0,94	miR-491-5p / miR-132	0,94
miR-107 / miR-146b	0,97	let-7e / miR-210	0,94
miR-181b / miR-335	0,89	miR-491-5p / miR-9*	0,95
miR-491-5p / miR-146b	0,97	miR-107 / miR-323-3p	0,84
Let-7e / miR-411	0,89	miR-491-5p / miR-323-3p	0,84
miR-9 / miR-146a	0,97	miR-155 / miR-146a	0,95
miR-181a / miR-335	0,89	miR-491-5p / miR-134	0,91
let-7e / miR-146b	0,97	miR-155 / miR-411	0,87
miR-9 / miR-146b	0,97	let-7e / miR-874	0,85
let-7e / miR-146a	0,97	miR-181b / miR-210	0,91
miR-155 / miR-874	0,88	miR-9 / miR-874	0,85
miR-155 / miR-9*	0,97	miR-155 / miR-16	0,92
miR-744 / miR-146a	0,94	miR-155 / miR-134	0,88
let-7e / miR-9*	0,97	miR-9 / miR-485-3p	0,89
miR491-5p / miR-411	0,89	miR-744 / miR-134	0,92
miR-155 / miR-210	0,94	miR-181b / miR-323-3p	0,82
let-7e / miR-132	0,86	miR-181b / miR-146b	0,94
miR-181b / miR-132	0,93		

R - Coeficiente de correlación para miARN numerador y denominador; La Tabla muestra los pares de miARN con AUC>0,9 y P<0,0001.

Sumario

La sensibilidad y especificidad de la detección de la PD y la diferenciación de MCI y AD es muy alta, alcanzando para algunos pares una precisión del 100 %:

**PD versus AMC**

let-7e/miR-335; let-7e/miR-411; miR-107/miR-146a; miR-107/miR-335; miR-107/miR-411; miR-155/miR-335; miR-181b/miR-335; miR-491-5p/miR-335; miR-491-5p/miR-411; miR-155/miR-146a

**PD versus MCI**

let-7e/miR-146a; let-7e/miR-335; let-7e/miR-miR-411; miR-107/miR-146a; miR-107/miR-335; miR-127/miR- 323-3p; miR-491-5p/miR-146a; miR-491-5p/miR-335; miR-491-5p/miR-9\*; miR-744/miR-335; miR-491-5p/miR- 146b

**PD versus AD**

miR-107/miR-146a; miR-107/miR-335; miR-127/miR-323-3p; let-7e/miR-411; miR-99b/miR-335; miR-491-5p/miR-146a; miR-491-5p/miR-335; miR-155/miR-132; miR-155/miR-335; miR-744/miR-335.

También es importante que algunos pares de miARN biomarcadores que detectan la PD o la diferencia de otras patologías neurodegenerativas con menor precisión combinados también demuestran una alta sensibilidad y especificidad (Figura 4). La Tabla 6 presenta datos típicos que demuestran la importancia de la correlación entre el numerador y el denominador en los pares de miARN biomarcadores: cuanto mayor es la correlación, menor es el valor P para diferenciar dos cohortes de sujetos.

**Tabla 6. La importancia de la correlación entre miARN numerador y denominador en pares de miARN biomarcadores.**

Comparado	Marcador	R	P
PD - AMC	let-7e/miR-335	0,95	0,00E+00
	let-7e/miR-370	0,74	1,08E-03
	let-7e/miR-451	0,4	2,59E-01
PD - MCI	miR-155/miR-335	0,93	9,60E-06
	miR-155/miR-370	0,72	1,31E-01
	miR-155/miR-451	0,52	3,08E-01
PD - AD	miR-107/miR-335	0,91	0,00E+00
	miR-107/miR-16	0,75	1,90E-04
	miR-107/miR-370	0,71	1,30E-02

**Comparado** - cohortes de sujetos comparadas. **R** - Coeficiente de correlación para miARN numerador y denominador. **P** - Valor P.

La Tabla 7 presenta listas de miARN usados como numeradores y denominadores en los mejores pares de miARN biomarcadores (capaces de diferenciar la PD de AMC, MCI y AD con valor P < 2E-04).

**Tabla 7. La lista de miARN numerador y denominador más común en pares de miARN biomarcadores capaces de diferenciar varias cohortes de sujetos**

Cohortes comparadas	Numeradores	Denominadores
	Nombre	Nombre
PD-AMC	miR-107	miR-335
	let-7e	miR-411
	miR-491-5p	miR-132
	miR-155	miR-134
	miR-99b	miR-146a

	Cohortes comparadas	Numeradores	Denominadores
		Nombre	Nombre
5		miR-127	miR-146b
		miR-744	miR-323-3p
10	<b>PD-MCI</b>	let-7e	miR-9*
		miR-107	miR-132
		miR-127	miR-146a
15		miR-155	miR-146b
		miR-181a	miR-335
		miR-181b	miR-411
20		miR-370	miR-432
		miR-744	miR-487
		miR-9	miR-874
		miR-99b	miR-134
25		miR-491-5p	miR-323-3p
			miR-485-3p
30	<b>PD-AD</b>	let-7e	miR-9*
		miR-107	miR-132
		miR-127	miR-146a
		miR-155	miR-146b
35		miR-181a	miR-335
		miR-181b	miR-210
		miR-744	miR-411
40		miR-9	miR-874
		miR-99b	miR-134
		miR-491-5p	miR-323-3p
45		miR-411	miR-485-3p

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar la enfermedad de Parkinson (PD) en un sujeto, preferentemente un sujeto humano, cuyo método comprende:
  - a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de suero o plasma sanguíneo recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro es miARN neuronal enriquecido en el mesencéfalo que es let-7e;
  - b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra recolectada del sujeto;
  - c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
  - d) comparar la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente en sujetos sanos de la misma edad, y
  - e) (i) identificar al sujeto como afectado por la PD cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente en sujetos sanos de la misma edad o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la PD cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la relación de control correspondiente en sujetos sanos de la misma edad, en donde dicho primer miARN y dicho segundo miARN se seleccionan de los siguientes pares: let-7e/miR-335, let-7e/miR-9\*, let-7e/miR-132, let-7e/miR-134, let-7e/miR-411, let-7e/miR-146b, let-7e/miR-146a, y let-7e/miR-323-3p.
  
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además refinar el diagnóstico mediante las siguientes etapas, etapas que se pueden realizar de manera simultánea o secuencial entre sí y con las etapas (d)-(e) de la reivindicación 1:
  - f) comparar la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) con el intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de una segunda enfermedad neurodegenerativa diferente de la PD;
  - g) (i) excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa en el sujeto si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) no cae dentro del intervalo estándar de las relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa, o (ii) no excluir el diagnóstico de la segunda enfermedad neurodegenerativa si la relación de los niveles de los miARN calculada en la etapa (c) cae dentro del intervalo estándar de relaciones de dichos miARN características de la segunda enfermedad neurodegenerativa.
  
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicha segunda enfermedad neurodegenerativa se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer (AD) y el Deterioro Cognitivo Leve (MCI).
  
4. El método de la reivindicación 2, en donde el par del primer miARN y el segundo miARN es let-7e/miR335 o let-7e/miR-411.
  
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende medir los niveles de los miARN en dos o más muestras de fluido corporal recolectadas del sujeto, en donde las muestras se han recolectado en puntos de tiempo separados.
  
6. El método de la reivindicación 1, que comprende además normalizar los niveles del primer y segundo miARN al nivel de un miARN normalizador, preferentemente en donde el miARN normalizador es miARN que se expresa en numerosos tejidos pero no se expresa significativamente en el cerebro.
  
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el nivel de los miARN se determina mediante el uso de un método seleccionado del grupo que consiste en hibridación, RT-PCR y secuenciación.
  
8. Un método para diferenciar a un sujeto con enfermedad de Parkinson (PD) de un sujeto con enfermedad de Alzheimer o con Deterioro Cognitivo Leve, preferentemente un sujeto humano, cuyo método comprende:
  - a) medir el nivel de un primer miARN enriquecido en el cerebro en una muestra de suero o plasma sanguíneo recolectada del sujeto, en donde dicho primer miARN enriquecido en el cerebro es miARN neuronal enriquecido en el mesencéfalo que es let-7e;
  - b) medir el nivel de un segundo miARN en la misma muestra recolectada del sujeto;
  - c) calcular la relación de los niveles del miARN medido en las etapas (a) y (b);
  - d) comparar la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) con una relación de control correspondiente, e
  - e) (i) identificar al sujeto como afectado por la PD cuando la relación de los niveles de miARN calculada en la etapa (c) es mayor que la relación de control correspondiente o (ii) identificar al sujeto como no afectado por la PD cuando la relación de los niveles del miARN calculada en la etapa (c) no es mayor que la relación de control correspondiente, en donde dicho primer miARN y dicho segundo miARN se seleccionan de los siguientes pares: let-7e/miR-210, let-7e/miR-874

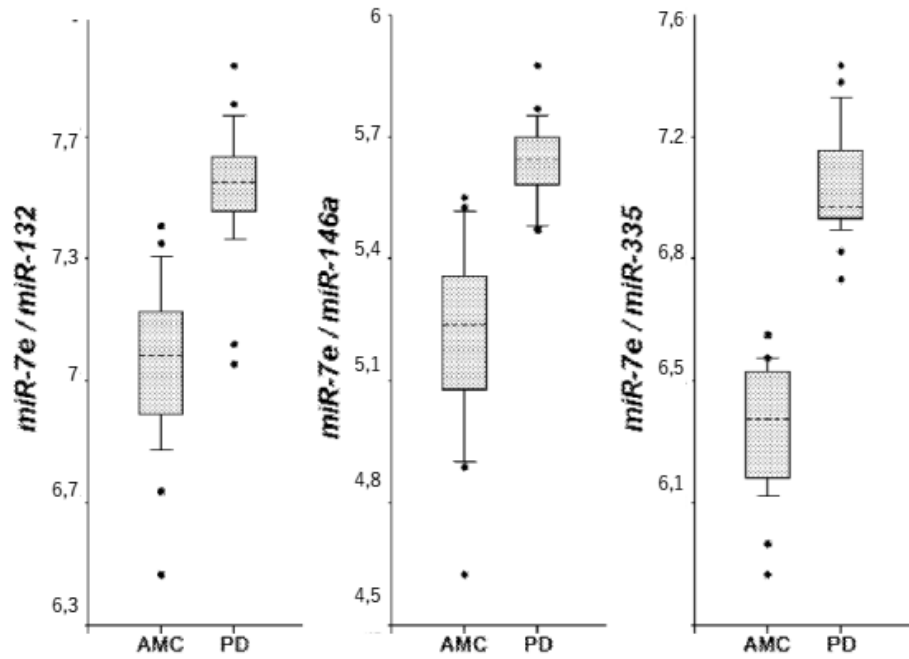
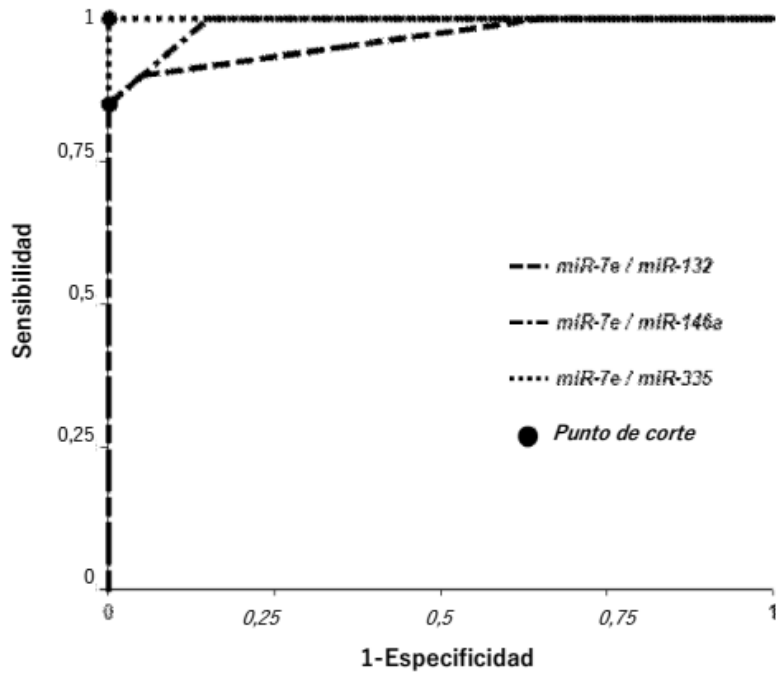


Figura 1A



Nombre	miR-7e / miR-132	miR-7e / miR-146a	miR-7e / miR-335
AUC	0,96	0,99	1,00
Sensibilidad	0,85	0,85	1,00
Especificidad	1,00	1,00	1,00
Precisión	0,93	0,93	1,00

Figura 1B

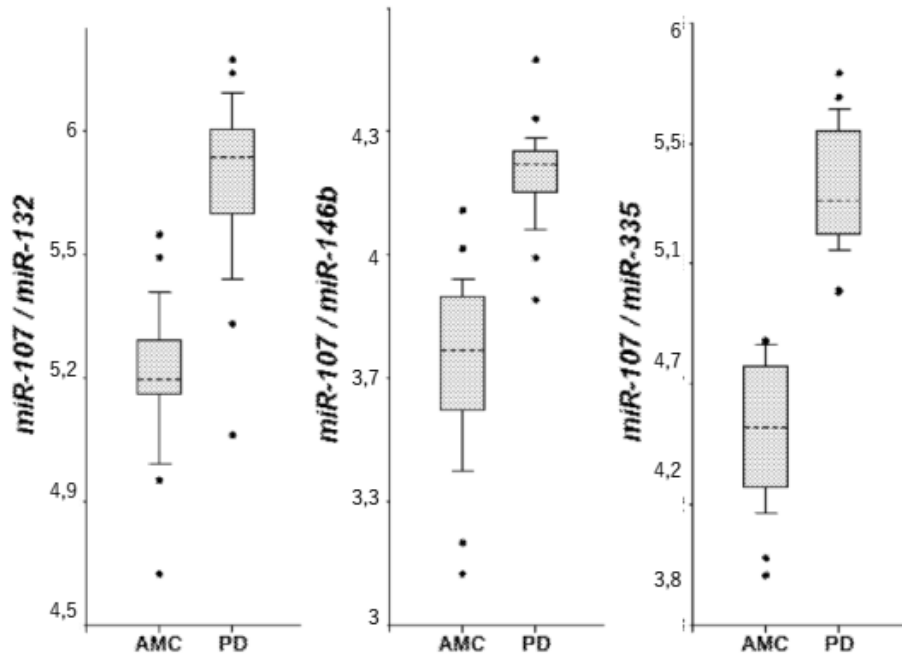
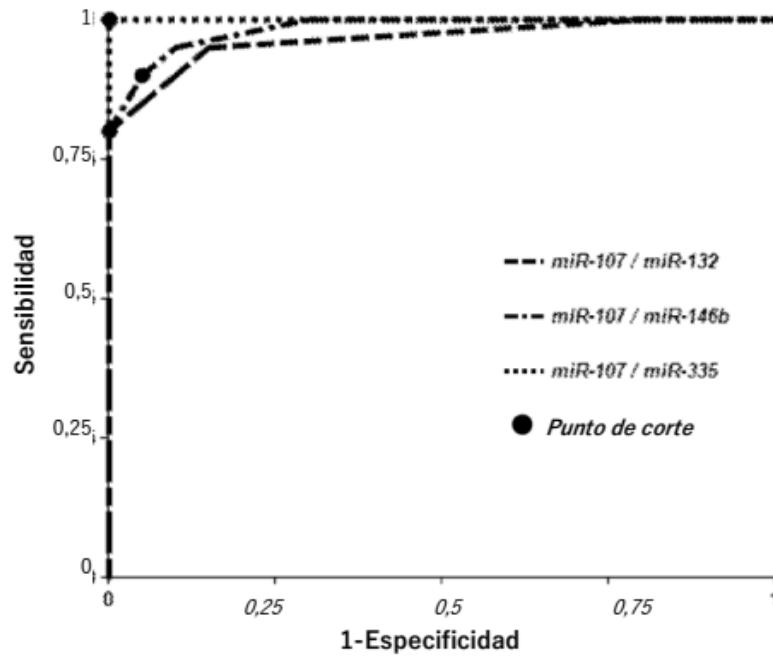


Figura 1C



Nombre	miR-107 / miR-132	miR-107 / miR-146b	miR-107 / miR-335
AUC	0,97	0,98	1,00
Sensibilidad	0,80	0,90	1,00
Especificidad	1,00	1,00	1,00
Precisión	0,90	0,93	1,00

Figura 1D

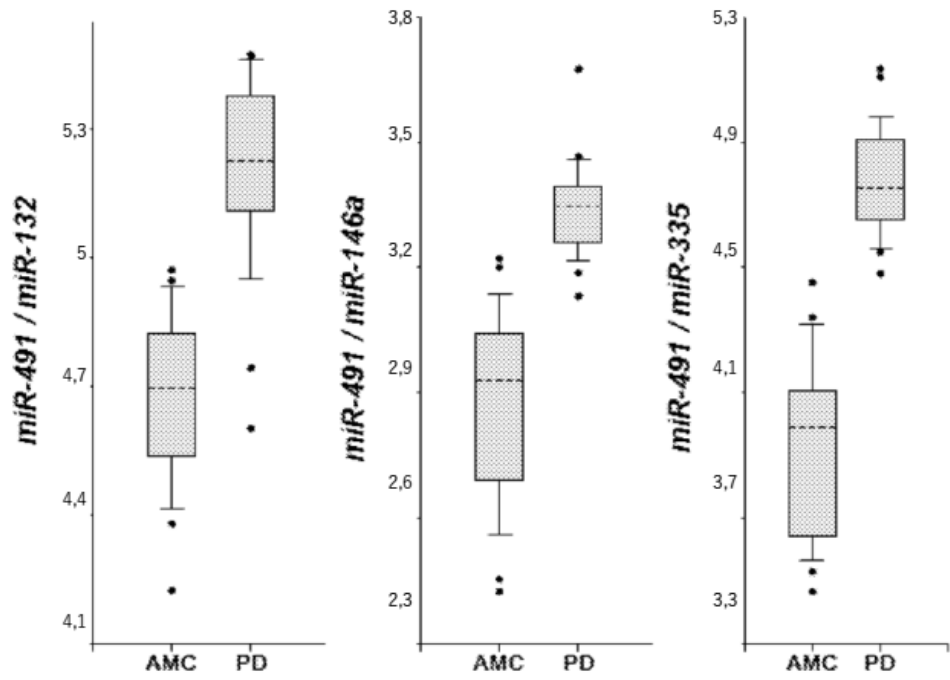
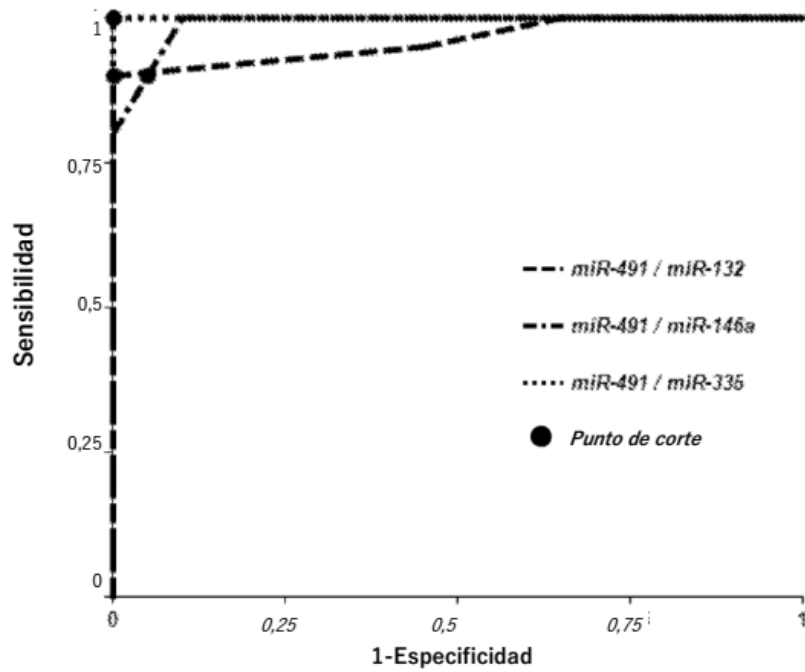


Figura 1E



Nombre	miR-491 / miR-132	miR-491 / miR-146a	miR-491 / miR-335
AUC	0,96	0,99	1,00
Sensibilidad	0,90	0,90	1,00
Especificidad	1,00	0,95	1,00
Precisión	0,93	0,93	1,00

Figura 1F



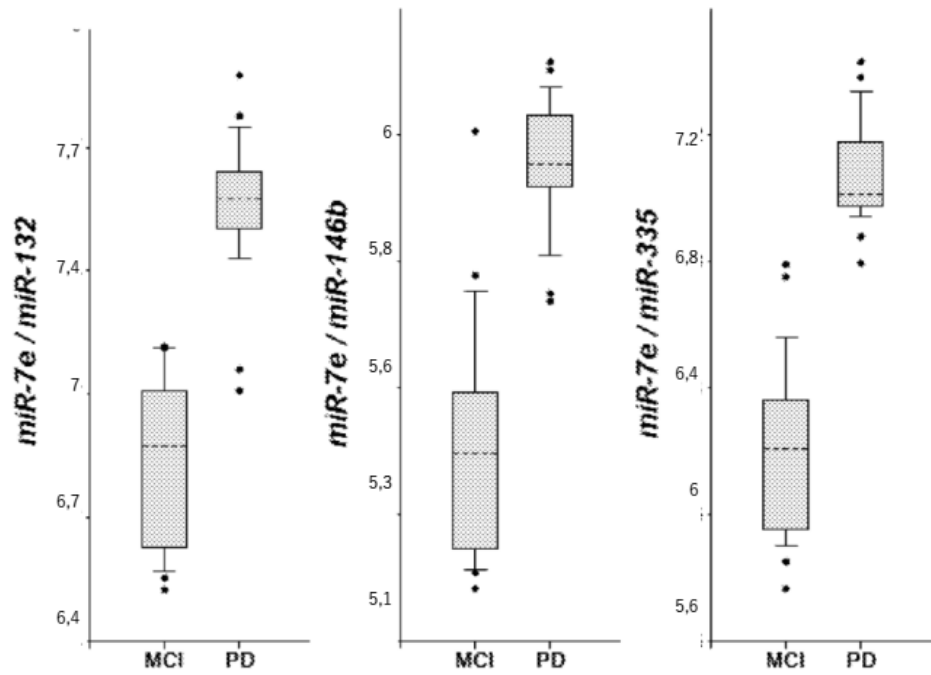
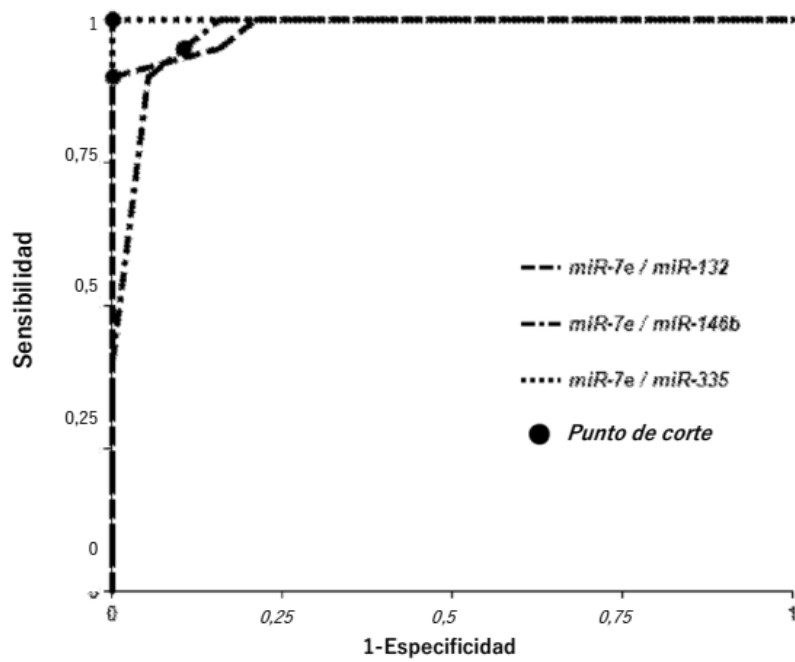


Figura 2A



Nombre	miR-7e / miR-132	miR-7e / miR-146b	miR-7e / miR-335
AUC	0,99	0,98	1,00
Sensibilidad	0,90	0,95	1,00
Especificidad	1,00	0,89	1,00
Precisión	0,95	0,92	1,00

Figura 2B

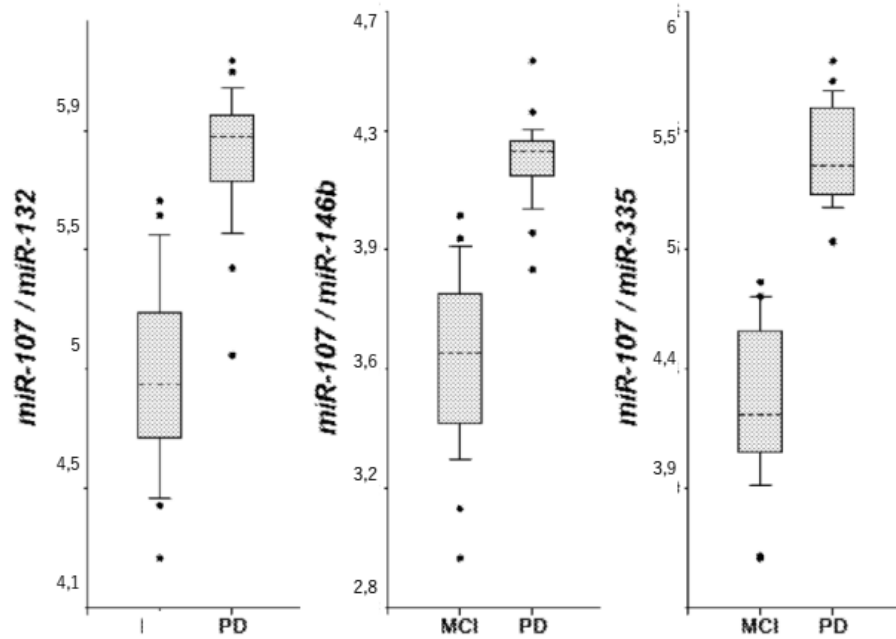
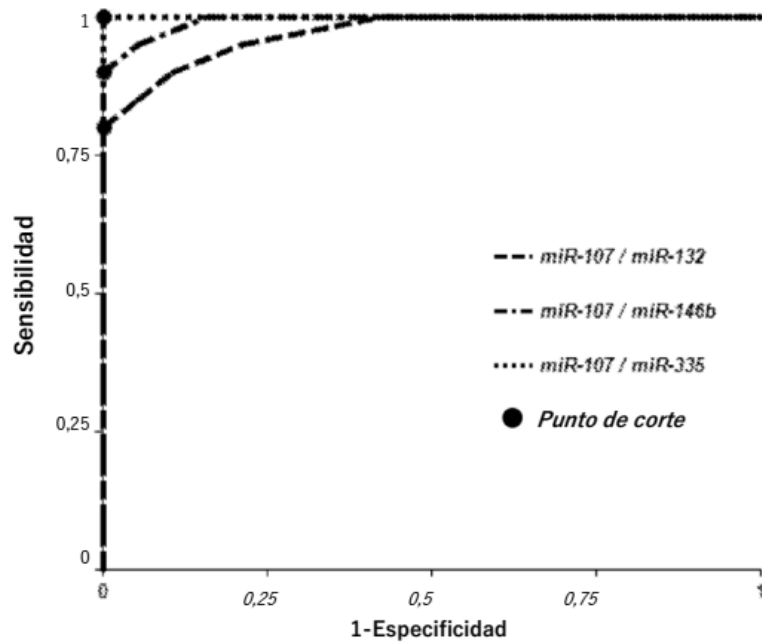


Figura 2C



Nombre	miR-107 / miR-132	miR-107 / miR-146b	miR-107 / miR-335
AUC	0,97	0,99	1,00
Sensibilidad	0,80	0,90	1,00
Especificidad	1,00	1,00	1,00
Precisión	0,90	0,93	1,00

Figura 2D

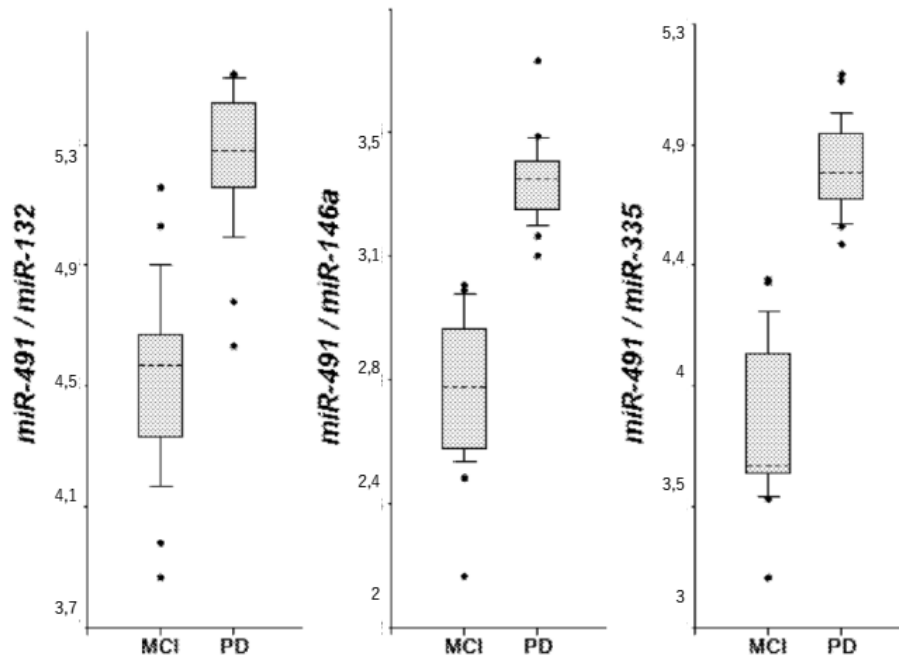
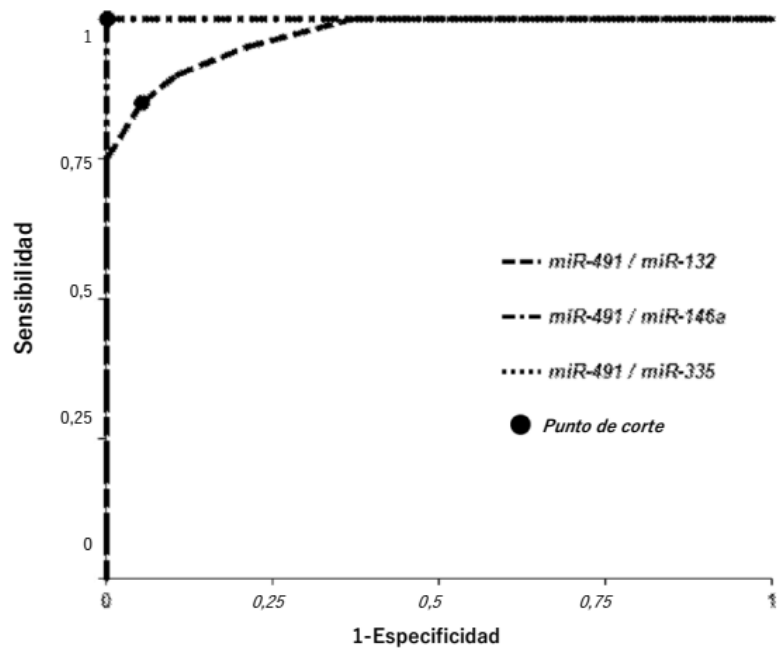


Figura 2E



Nombre	miR-491 / miR-132	miR-491 / miR-146a	miR-491 / miR-335
AUC	0,97	1,00	1,00
Sensibilidad	0,85	1,00	1,00
Especificidad	0,95	1,00	1,00
Precisión	0,90	1,00	1,00

Figura 2F

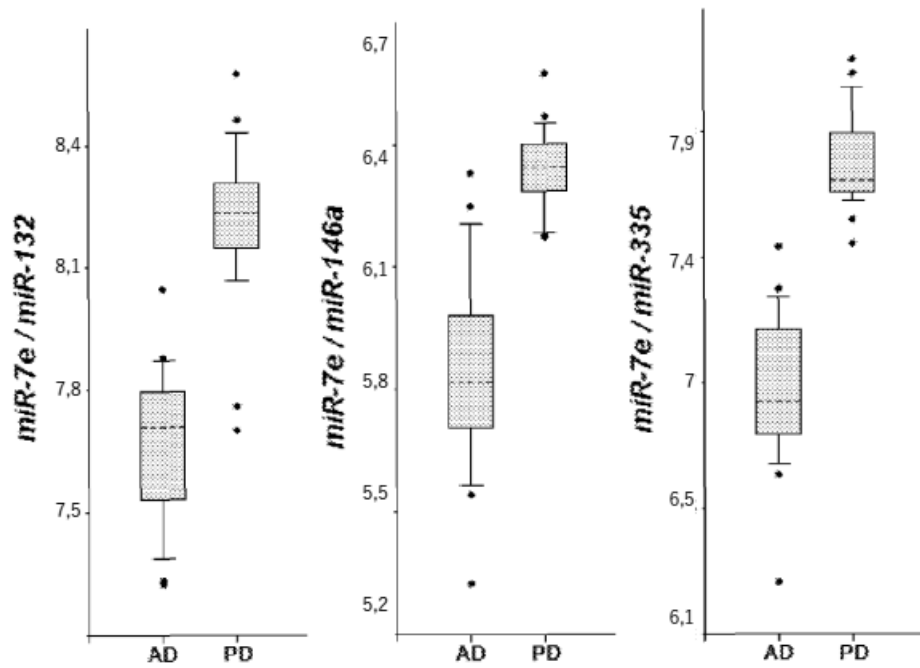
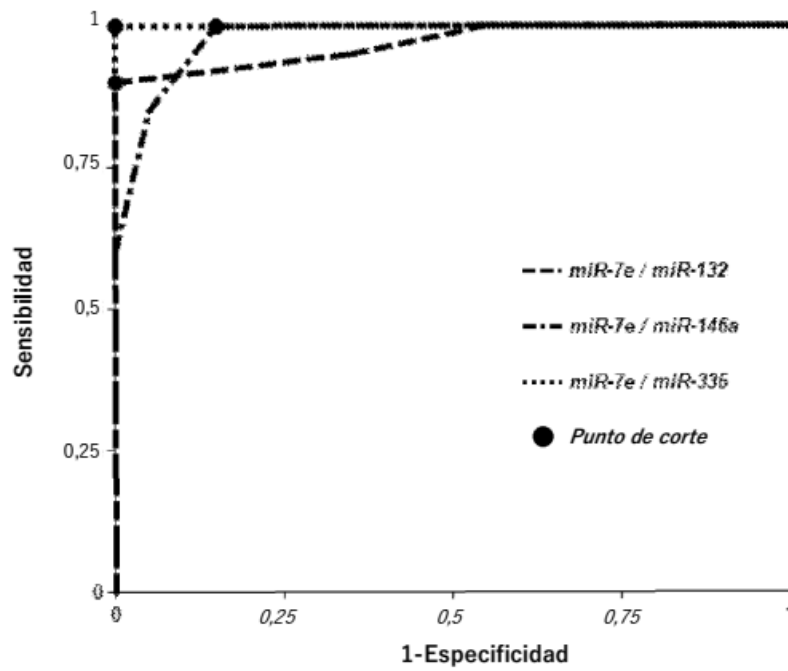


Figura 3A



Nombre	miR-7e / miR-132	miR-7e / miR-146a	miR-7e / miR-335
AUC	0,97	0,98	1,00
Sensibilidad	0,90	1,00	1,00
Especificidad	1,00	0,85	1,00
Precisión	0,95	0,93	1,00

Figura 3B

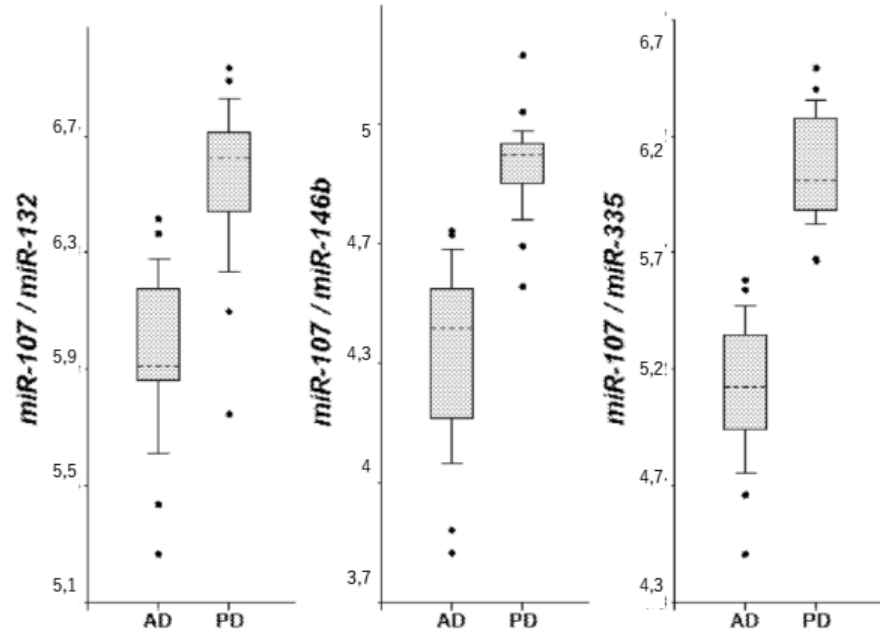
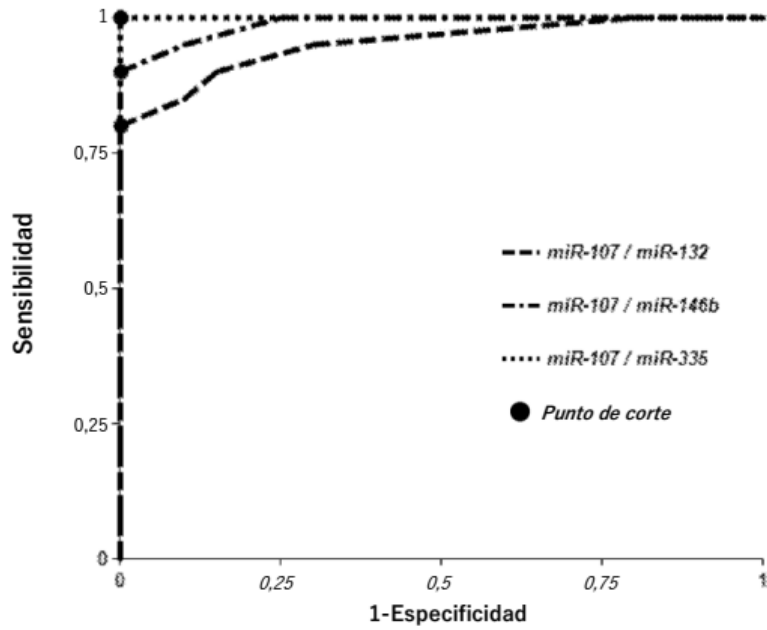


Figura 3C



Nombre	miR-107 / miR-132	miR-107 / miR-146b	miR-107 / miR-335
AUC	0,95	0,99	1,00
Sensibilidad	0,80	0,90	1,00
Especificidad	1,00	1,00	1,00
Precisión	0,90	0,95	1,00

Figura 3D

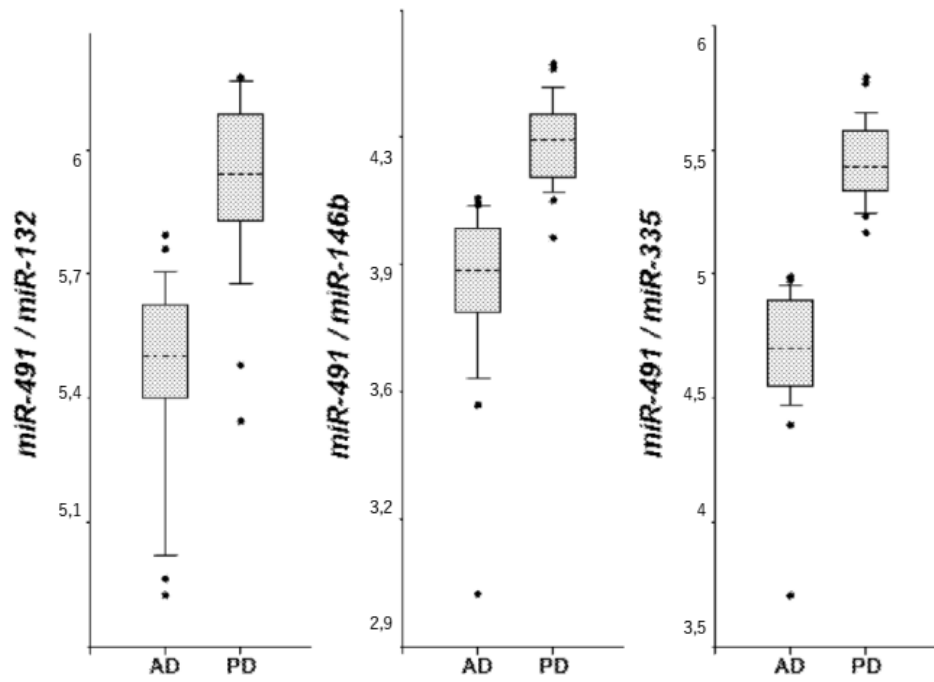
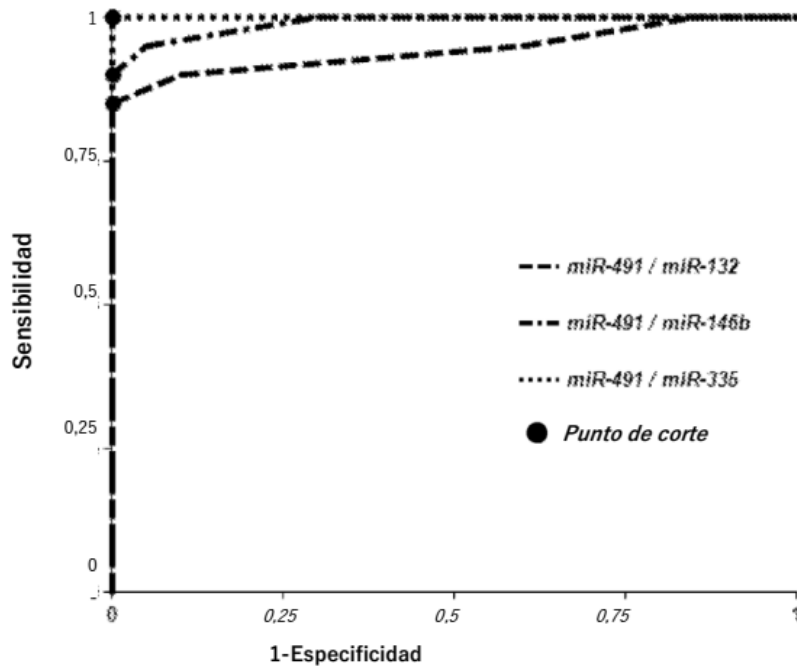
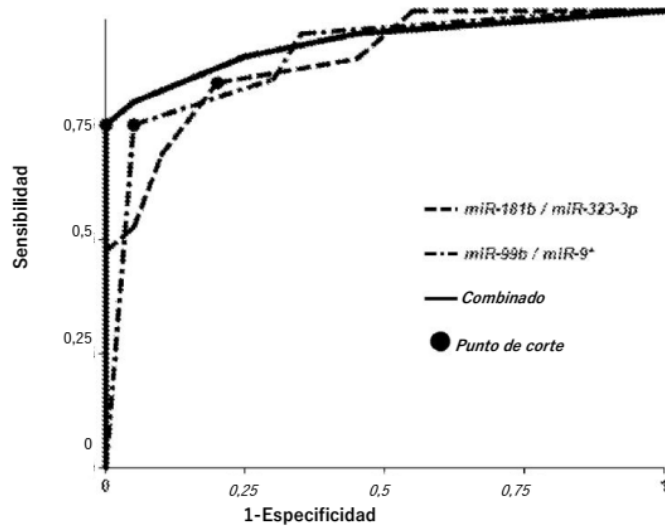


Figura 3E



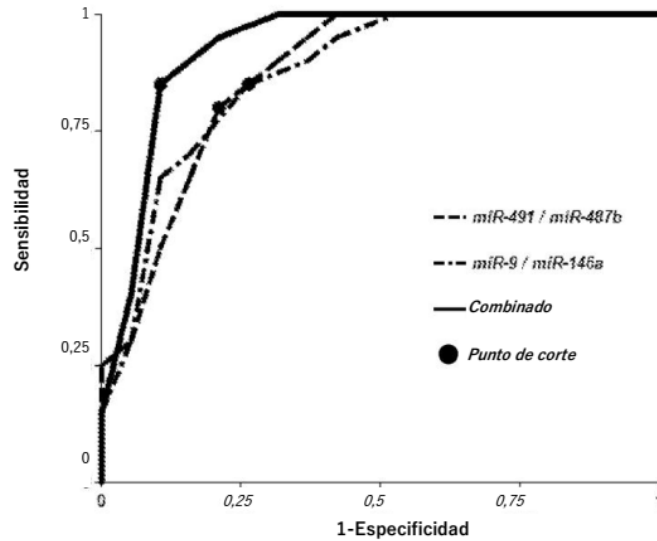
Nombre	miR-491 / miR-132	miR-491 / miR-146b	miR-491 / miR-335
AUC	0,97	0,99	1,00
Sensibilidad	0,85	0,90	1,00
Especificidad	1,00	1,00	1,00
Precisión	0,93	0,95	1,00

Figura 3F



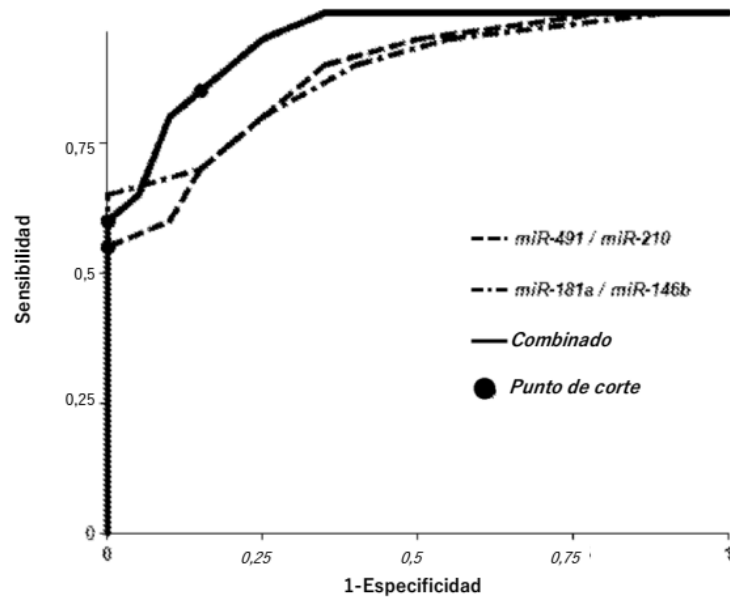
Nombre	miR-181b / miR-323-3p	miR-99b / miR-9*	Combinado
AUC	0,90	0,89	0,93
Sensibilidad	0,75	0,84	0,75
Especificidad	0,95	0,80	1,00
Precisión	0,85	0,82	0,88

Figura 4A



Nombre	miR-491 / miR-487b	miR-9 / miR-146a	Combinado
AUC	0,87	0,87	0,93
Sensibilidad	0,80	0,85	0,85
Especificidad	0,79	0,74	0,89
Precisión	0,79	0,79	0,87

Figura 4B



Nombre	miR-491 / miR-210	miR-181a / miR-146b	Combinado
AUC	0,88	0,88	0,95
Sensibilidad	0,55	0,60	0,85
Especificidad	1,00	1,00	0,85
Precisión	0,78	0,80	0,85

Figura 4C