

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 646 592**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2008 PCT/EP2008/057519**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2008 WO08152146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2008 E 08761038 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2162550**

54 Título: **Muestra de tejido periférico que contiene células que expresan 5HTR2C y/o ADARs, como marcadores de la alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C y sus aplicaciones**

30 Prioridad:

**13.06.2007 US 943685 P
24.01.2008 US 23239 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.12.2017

73 Titular/es:

**ALCEDIAG (100.0%)
Route des Michels, La Cornereille
13790 Peynier, FR**

72 Inventor/es:

**WEISSMANN, DINAH;
PUJOL, JEAN-FRANÇOIS;
VINCENT, LAURENT;
CAVAREC, LAURENT y
MANN, JOHN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 646 592 T3

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

DESCRIPCIÓN

Muestra de tejido periférico que contiene células que expresan 5HTR2C y/o ADARs, como marcadores de la alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C y sus aplicaciones

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para predecir una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición de A a I del ARN dependiente de ADAR, en particular el receptor de serotonina 2C (5HTR2C) en un paciente, a partir de una muestra de tejido periférico que contiene células que expresan dicho ARNm, tal como el ARNm de 5HTR2C, y/o desaminasas de adenosina que actúan sobre el ARN (ADARs), tal como una muestra de tejido de la piel. La presente invención comprende además el uso de un método de acuerdo con la invención para identificar si un agente es capaz de modificar *in vivo* la edición del ARNm de 5HTR2C en tejido cerebral o controlar 10 la eficacia de un fármaco destinado a prevenir o tratar una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C en el tejido cerebral, comprendiendo estos métodos la aplicación de dichos marcadores de tejido periférico. En un aspecto particular, la presente invención se refiere a tales métodos en los que la tasa o el perfil de edición del ARNm de 5HTR2C, cuando es necesario, se determina por un método de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) después de la amplificación mediante una PCR, preferiblemente mediante una PCR anidada, del fragmento de ARNm específico que contiene los sitios de edición, 15 por lo que es posible, en condiciones analíticas dadas, obtener la tasa y/o el perfil de edición de ese ARNm de 5HTR2C editado a partir de dicho tejido periférico. Finalmente la invención se refiere a determinados cebadores de ácido nucleico aplicados en dicha PCR anidada.

20 Estudios de asociación genética, ratones con inactivaciones génicas y análisis post mortem han sugerido la implicación del receptor de serotonina 2C (5HTR2C) en trastornos neuropsiquiátricos. En primer lugar un polimorfismo alélico funcional (Cys23Ser) de 5HTR2C se asocia con depresión y trastorno bipolar (Lerer et al., 2001, Mol. Psychiatry 6:579-585). En segundo lugar, los ratones que no presentan el receptor de serotonina 5HT2C manifiestan convulsiones espontáneas, alteraciones cognitivas y un control anormal de la conducta alimentaria (Tecott et al., 1995, Nature 374:542-546). Estos animales también son hipersensibles al estrés repetido (Chou-green et al., 2003, 25 Physiol. Behav. 79:217-226). En tercer lugar, en cerebros post mortem de pacientes afectados por trastorno bipolar o esquizofrenia, la expresión del ARN del receptor de serotonina 5-HT2C se encuentra regulada negativamente (Iwamoto et al., 2004, Mol. Psychiatry 9:406-416; Castensson et al., 2003, Biol. Psychiatry 54:1212-1221).

También se cree que la edición del ARN de 5HTR2C participa en la fisiopatología de los trastornos mentales y la acción de antidepresivos (Seeburg, 2002, Neuron 35:17-20). Se editan cinco residuos de adenosina en una región 30 que codifica el segundo bucle intracelular de 5HTR2C y se pueden producir sustituciones de aminoácidos en tres posiciones diferentes de la secuencia del receptor. La sustitución combinatoria de estos residuos amino genera hasta 24 isoformas diferentes de la proteína 5HTR2C con diferentes eficiencias de acoplamiento a G (Price et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:44663-44668). En ratones, cuando se compara con las cepas endogámicas C57BL/6 y 129sv, la cepa BALB/c muestra un patrón de edición del pre-ARNm de 5HTR2C neocortical del cerebro frontal basal diferente, lo que podría subyacer a su diferencia en la reactividad frente al estrés. Además, los ratones BALB/c muestran cambios inducidos por el estrés en la edición del pre-ARNm de 5HTR2C que son similares a los detectados en cerebros de víctimas de suicidio depresivo (Englander et al., 2005, J. Neurosci.25:648-651). De hecho, en cerebros post mortem, se ha informado de una edición alterada del ARN de 5HTR2C en pacientes con esquizofrenia, depresión y aquellos que habían cometido suicidio (Niswender et al., 2001, 40 Neuropsychopharmacology 24:478-491; Sodhi et al., 2001, Mol. Psychiatry 6:373-379; Gurevich et al., 2002, Neuron 34:349-356). Además, el interferón se utiliza en el tratamiento de la hepatitis C, pero hay síntomas de depresión que aparecen con frecuencia como un efecto secundario de esta molécula en los pacientes, y Yang et al. han demostrado que esta molécula altera fuertemente la edición de 5HTR2C (véase la ref. en Tohda et al., 2006, J. Pharmacol. Sci.100:427-432).

45 Estudios previos han mostrado que 5HTR2C se expresa principalmente en el cerebro, particularmente en el plexo coroide, corteza prefrontal, áreas límbicas, ganglios basales e hipotálamo (Tohda et al., 1996, Neurosci. Res., 24:189-193; Julius et al., 1988, 241:558-564; Pasqualetti et al., 1999, Neuroscience 92:601-611). Este patrón de expresión específicamente cerebral restringe a estudios post mortem las investigaciones de asociaciones potenciales existentes entre la edición del ARN de 5HTR2C y un estado psiquiátrico. En busca de tejidos que estén disponibles más fácilmente, que reflejen posiblemente el estado de edición de HTR2C en el SNC y que permitan un análisis cuantitativo en pacientes con diferentes estados psiquiátricos, Marazziti y colaboradores han detectado la presencia de ARNm de 5HTR2C en linfocitos en reposo (Marazziti et al., 2001, Neuropsychobiology, 43:123-126). Por desgracia, en estas células el nivel de expresión del 5HTR2C, según lo revelado por RT-PCR/transferencia Southern, es demasiado bajo para un análisis cuantitativo posterior de la edición de ARN.

55 Recientemente, Slominski y colaboradores han mostrado que la piel humana y células cultivadas obtenidas a partir de la piel, tienen la capacidad de transformar L-triptófano a serotonina y de metabolizar la serotonina a N-acetilserotonina y melatonina (Slominski et al., 2002, FASEB J., 16:896-898). Han sometido a ensayo además mediante RT-PCR anidada, la expresión de genes que codifican los receptores de esta ruta metabólica cutánea serotoninérgica/melatoninérgica. La piel humana completa y células de la piel cultivadas normales y patológicas, expresan predominantemente genes que codifican las isoformas 5-HT2B y 5HT7 del receptor de serotonina. La expresión de otras isoformas de los receptores de serotonina es menos frecuente y 5HTR2C rara vez se detecta 60

(Slominski et al., 2003, J. Cell. Phys., 196:144-153).

Los miembros de la familia de genes de ADAR (desaminasas de adenosina que actúan sobre ARN) están involucrados en un tipo de edición de ARN que convierte residuos de adenosina a inosina. El proceso de edición del ARN es un fenómeno generalizado en eucariotas que conduce a cambios de bases postranscripcionales en el ARNm. En los mamíferos, se ha identificado un número creciente de genes que se someten a un tipo de edición de ARN que se caracteriza por una modificación selectiva de sitio, de adenosina a inosina.

Entre los sustratos de la edición de A a I se encuentran los transcritos específicos del cerebro que codifican los receptores de glutamato de tipo AMPA (como GluR2 y GluR4) y los receptores de serotonina acoplados a la proteína G (como 5HTR2C). En la subunidad B de GluR (GluR-B), una posición de edición única (el sitio Q/R) controla la permeabilidad para Ca²⁺ del canal iónico, mientras que otra posición (el sitio R/G) regula la cinética de desensibilización del receptor. Esta propiedad de los receptores AMPA es decisiva para una función cerebral normal. Debido a la importancia de una edición de ARN precisa para una función cerebral normal, la desregulación de la actividad de edición puede influir en la progresión de procesos fisiopatológicos, tales como enfermedades neurodegenerativas o tumorigénesis (consecuencias cognitivas de la epilepsia, tumores, vigilia del sueño, trastornos alimentarios del estado de ánimo (Maas S et al., (1996) J. Biol. Chem. 271, 12221-26; Sergeeva OA et al. (2007) Cell Mol Neurobiol. 27:669-680.

Otro sustrato de la edición de A a I con ADAR que se ha identificado a nivel de linfocitos T como una isoenzima de las fosfodiesterasas, es la fosfodiesterasa 8A1. Los sitios de edición 6 a 7 se han identificado y podrían estar modulados en estado patológico (lupus eritematoso sistémico) y después de la acción del fármaco (interferón alfa).

Es importante señalar que esta isoenzima está presente en el cerebro (Orlowski RJ et al., 8A1 gene transcripts of systemic lupus erythematosus T lymphocytes. Immunology 2008, en prensa; Wang P et al., phosphodiesterase 8A (PDEA8) splice variants: cloning, gene organization and tissue distribution. (2001) Gene 280 183-194).

Entre los sustratos específicos del cerebro de ADAR, la edición de A a I del ARNm de 5HTR2C conduce a una sustitución de tres residuos de aminoácidos situados dentro del dominio intracelular del bucle II, dando como resultado alteraciones espectaculares en las funciones de acoplamiento de la proteína G del receptor (Yang W et al., Brain Res Mol Brain Res. 2004, 124(1):70-78). Cuatro enzimas de la edición del ARN de A a I, denominadas ADAR1, ADAR2, ADAR3 y ADAT1, se han clonado a partir de mamíferos. Las isoformas ADAR1 y ADAR2 se expresan de forma generalizada en una variedad de células y tejidos, teniendo la mayor expresión en el cerebro y el bazo y son las ADARs esenciales que participan en la edición del ARNm de 5HTR2C (ADAR 3 fue identificada únicamente en el cerebro y su actividad desaminasa todavía no ha sido establecida y ADAT1 se dirige al ARNt). El ARNm de 5HTR2C se edita en cinco residuos de adenosina muy próximos entre sí (denominados sitios de edición A, B, C, D y E) que permiten la generación de 32 variantes diferentes de ARNm y 24 isoformas proteicas diferentes del receptor que oscilan desde la isoforma no editada Ile156-Asn158-Ile160 (INI) a la isoforma totalmente editada Val156-Gly158-Val160 (VGV). Se sabe que ADAR1 solo está implicada en los sitios de edición A y B, ADAR1 y ADAR2 en los sitios de edición E y C, y ADAR2 solo en el sitio de edición D. (Dracheva et al., Molecular Psychiatry, 2007, 1-10).

Se conoce que el interferón alfa (IFN-alfa) causa frecuentemente depresión grave en pacientes tratados por hepatitis vírica crónica y ciertas enfermedades malignas. Se han observado los efectos de IFN-alfa sobre la edición del ARN en líneas celulares de glioblastoma humano (Yang et al., Beyond the Identification of Transcribed Sequences: Functional, Evolutionary and Expression Analysis, 12^o International Workshop, Octubre 25-28, 2002, Washington, DC, Intracellular Trafficking of A Few Inflammation-Inducible ADAR1 Isoform). También se ha observado *in vivo* en el ratón BALB/c, que la administración de interferón alfa, conocido por ser un potente activador de la expresión de ADAR1 150 *in vitro* en líneas de células de glioblastoma humano (Yang, W., et al., 2004), induce también cambios subsiguientes en el perfil de edición del 5HTR2C en la corteza prefrontal dorsal.

Con el fin de permitir unos parámetros predictivos rápidos y validados de modificaciones generales del proceso de edición, sigue siendo deseable:

- proporcionar un método que permita extrapolar alteraciones de la tasa o el perfil de edición de estos sustratos de ADAR, particularmente los receptores de glutamato de tipo AMPA o el ARNm de 5HTR2C, en el tejido cerebral humano a partir de una muestra biológica que se pueda obtener fácilmente a partir del paciente que se va a someter a ensayo, y en donde se prefiere que la tasa o el perfil de edición de esos sustratos de ADAR determinados en esta muestra biológica se puedan correlacionar con el obtenido a partir de una muestra biológica del cerebro; y/o
- identificar un marcador presente en una muestra biológica que se pueda obtener fácilmente a partir del paciente que se va a someter a ensayo, en donde el análisis cualitativo y/o cuantitativo de dicho marcador en dicha muestra se pueda correlacionar con una alteración de la tasa o el perfil de edición de esos sustratos de ADAR en el tejido cerebral, dicha muestra biológica y el marcador asociado se podrían utilizar como un informador de la edición del receptor observada en el SNC (sistema nervioso central).

Este es precisamente el objeto de la presente invención.

La presente invención se refiere al uso o a un método que implementa una muestra biológica que consiste en tejidos periféricos que contienen células para la evaluación de una alteración patológica de la edición de A a I del ARNm de 5HTR2C dependiente de ADAR en el cerebro, en donde dicho tejido periférico que contiene células es una muestra de piel de mamífero.

La presente invención también se refiere al uso o a un método que implementa una sola muestra biológica o dos muestras biológicas diferentes, seleccionadas a partir del grupo de muestras biológicas que consiste en tejidos periféricos que contienen células para la evaluación de la alteración patológica de la edición de A a I del ARNm de 5HTR2C dependiente de ADAR en el cerebro.

La presente invención también se refiere al uso o a un método que implementa como muestra informadora aislada o asociada para la evaluación de la alteración patológica de dicha edición del ARNm en el cerebro:

- un primer tejido periférico que contiene células, tal como una muestra de piel procedente de un mamífero; y/o
- un segundo tejido periférico que contiene células, tal como una muestra de sangre procedente de un mamífero.

En una realización preferida, dicho ARNm editado cuya edición es una edición de A a I del ARN dependiente de ADAR, es un ARNm seleccionado a partir del grupo que consiste en el ARNm que codifica un receptor de glutamato de tipo AMPA, un receptor de serotonina acoplado a proteína G y el PDEA8.

En una realización preferida, la evaluación de la alteración patológica de la edición de ARNm en el cerebro se determina mediante:

- la tasa o tasas o el perfil de edición de las formas editadas de dicho ARNm en dicha muestra biológica periférica; y/o
- la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra biológica periférica.

En una realización más preferida, dicho ARNm que tiene una edición de A a I de ARN dependiente de ADAR, es el ARNm de 5HTR2C.

Los inventores han encontrado que la medida de los cambios en la expresión de las ADARs en la periferia (tal como en la piel y opcionalmente en la sangre), podía predecir una alteración importante de la edición en el cerebro.

Los inventores han demostrado, por ejemplo, que la determinación de la edición del ARNm de 5HTR2C y/o la determinación de las actividades de ADARs expresadas en células contenidas en el tejido periférico que expresan el 5HTR2C y/o ADARs, como la piel y, opcionalmente, en una muestra de tejido sanguíneo, se pueden utilizar como marcadores informadores de la alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C en el tejido cerebral y, por tanto, para la evaluación de una alteración patológica de la ruta de múltiples etapas y metabólica del sistema serotoninérgico expresado en el SNC.

Los inventores han demostrado, por ejemplo, que las ADARs esenciales, responsables de la edición del 5HTR2C de mamífero, que son las dos isoformas de ADAR1 (denominadas en lo sucesivo "ADAR1-150" y "ADAR1-110" por la proteína ADAR1-150 kD y la proteína ADAR1-110 kD) y ADAR2, todas ellas se expresan en cantidad suficiente en dicho tejido periférico que contiene células, en particular en una muestra de piel y en los glóbulos blancos de una muestra de sangre, con el fin de ser analizadas cualitativa y/o cuantitativamente y para utilizar este tejido periférico que contiene células y las ADARs como una muestra informadora y un marcador para la evaluación de la alteración patológica de la ruta de múltiples etapas y metabólica del sistema serotoninérgico expresado en el SNC.

También han demostrado lo contrario a lo que se ha indicado en la técnica anterior para una muestra de piel (Slominski et al., 2003, J. Phy Cell., 196, 144-153), cierto tejido periférico que contiene células, tales como células de un muestra de piel, expresa ARNm de 5HTR2C de forma suficiente para ser detectado y analizado para evaluar la tasa o el perfil de edición del ARNm de 5HTR2C, y opcionalmente, la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs contenidas.

En consecuencia,

- la determinación de una expresión alterada o normal (en su naturaleza y/o en la cantidad) de las enzimas ADARs, en particular las isoformas de ADAR1 (en particular "ADAR1-150" y "ADAR1-110") y ADAR2, en tejido periférico que contiene células que expresan estas ADARs, tal como en una muestra de tejido de piel y opcionalmente sanguíneo, que contiene células; y/o
- la determinación de la tasa o el perfil de edición del ARNm de 5HTR2C de las formas editadas del ARNm

de 5HTR2C en tejido periférico que contiene células que expresan el ARNm de 5HTR2C, tal como en una muestra de tejido de piel y opcionalmente sanguíneo, que contiene células,

se pueden utilizar como marcadores informadores de la alteración del mecanismo de la edición del ARNm de 5HTR2C en el tejido cerebral y, por tanto, para la evaluación de una alteración patológica de la ruta de múltiples etapas y metabólica del sistema serotoninérgico expresado en el SNC de un paciente.

Finalmente, la determinación de una expresión alterada o normal de las enzimas ADARs, sola o en asociación con la determinación de la tasa o el perfil de edición del ARNm de 5HTR2C de las formas editadas del ARNm de 5HTR2C, en una o varias muestras de tejido periférico que contiene células, tal como en una muestra de tejido de piel y opcionalmente de sangre que contiene células, se puede utilizar como muestra(s) informadora(s) y marcadores:

- 10 – para identificar *in vitro* si un paciente presenta una patología o tiene riesgo de desarrollar una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición de ARNm del receptor de serotonina 2C (5HTR2C);
- para determinar *in vitro* si una patología mostrada por un paciente está relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C;
- 15 – para seleccionar un compuesto capaz de modular la edición del ARNm de 5HTR2C en el tejido cerebral, preferiblemente un compuesto capaz de restaurar la edición normal del ARNm de 5HTR2C en el tejido cerebral de un paciente que lo requiere; o
- para determinar *in vitro* en un mamífero la eficacia de un fármaco utilizado para la prevención o para el tratamiento de una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 20 5HTR2C.

Por "tejido periférico" que contiene células, se entiende en el presente documento un tejido distinto del tejido cerebral y que preferiblemente es fácil de obtener, como en una biopsia general de órganos o tejidos fáciles de obtener, una muestra de piel, una muestra de sangre completa, una muestra de orina, muestra de saliva, una muestra de tejido de la mejilla interna, una citología exfoliativa de la vagina o de la mejilla interna o un frotis. Una muestra de piel y, 25 opcionalmente, de sangre que contiene células es la muestra de tejido periférico preferida que se implementa en la presente invención.

Por asociación de estos dos marcadores (ADARs y edición del ARNm de 5HTR2C), se entiende que la expresión de las ADARs se puede analizar en el mismo tipo de células, tal como las células utilizadas para la determinación de la edición del ARNm de 5HTR2C, por ejemplo, en una muestra de células de la piel), o que la expresión de las ADARs se puede analizar en un tipo de células, por ejemplo, una muestra de células sanguíneas, y la determinación de la edición del ARNm de 5HTR2C se lleva a cabo en otro tipo de células, por ejemplo, en una muestra de células de la piel.

Cada marcador se puede utilizar también solo si la determinación de ese marcador es suficiente para correlacionar su expresión en muestras de tejidos periféricos que contienen células, tales como en una muestra de tejido de la piel y, 35 opcionalmente, de sangre que contiene células, con la tasa o el perfil de edición del ARNm de 5HTR2C en el tejido cerebral.

En otro ejemplo, la determinación de la tasa o el perfil de edición del ARNm de 5HTR2C de las formas editadas del ARNm de 5HTR2C o la determinación de una expresión alterada o normal de las ADARs en una muestra de tejido de la piel que contiene células que expresan el ARNm de 5HTR2C y ADARs, también puede ser única como un 40 marcador informador de la alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C en el cerebro, si la correlación obtenida es suficiente con el marcador único utilizado.

En relación con el método para seleccionar un compuesto capaz de modular la edición del ARNm de 5HTR2C, las células del tejido periférico que expresan el ARNm de 5HTR2C y/o ADARs para la evaluación y la selección de tales compuestos, pueden ser líneas celulares o líneas celulares recombinantes en las que la expresión del ARNm de 45 5HTR2C y/o ADARs ha sido alterada con el fin, por ejemplo, de imitar la expresión patológica de ese ARNm de 5HTR2C y/o ADARs. Se pueden emplear particularmente en este aspecto células recombinantes de la piel u, opcionalmente, de la sangre o líneas celulares.

En particular, la presente invención comprende el uso de un tejido periférico que expresa el ARNm de 5HTR2C y/o ADARs, tal como una muestra de piel (células o tejido de la piel, o una biopsia) procedente de un mamífero, 50 preferiblemente un ser humano, un ratón o una rata, como una muestra informadora única o asociada para la evaluación de la alteración patológica del sistema de edición del ARNm de 5HTR2C expresada en el SNC, tal como en el cerebro.

Más particularmente, la presente invención comprende el uso de un tejido periférico que expresa el ARNm de 5HTR2C y/o ADARs: tal como una muestra de piel de un mamífero, preferiblemente un ser humano, un ratón o una 55 rata, como una muestra informadora única o asociada para la evaluación de la alteración patológica del sistema de

edición del ARNm de 5HTR2C expresada en el SNC, tal como en el cerebro, mediante:

- la determinación de la o las tasas o el perfil de edición de las formas editadas del ARNm de 5HTR2C en esa muestra de tejido periférico, tal como células de la piel; u, opcionalmente y si se utiliza como marcador asociado,
- 5 – determinar la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de tejido periférico.

En otra realización particular, la presente invención comprende el uso de una segunda muestra de tejido periférico, tal como una muestra de sangre completa procedente de un mamífero, preferiblemente una muestra de sangre de ser humano, ratón o rata, más preferiblemente glóbulos blancos, tal como una muestra informadora única o asociada para la evaluación de la alteración patológica del sistema de edición del ARNm de 5HTR2C expresada en el SNC, tal en el cerebro.

Más particularmente, la presente invención comprende el uso de dicho segundo tejido periférico, tal como una muestra de sangre completa procedente de un mamífero, preferiblemente una muestra de tejido periférico de ser humano, ratón o rata, preferiblemente glóbulos blancos, como una muestra informadora única o asociada para la evaluación de la alteración patológica del sistema de edición del ARNm de 5HTR2C expresada en el SNC, tal como en el cerebro, mediante:

- la determinación de la o las tasas o el perfil de edición de las formas editadas del ARNm de 5HTR2C en esa segunda muestra de tejido periférico, tal como células sanguíneas; u, opcionalmente y si se utiliza como marcador asociado,
- 20 – determinar la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha segunda muestra de tejido periférico.

En un primer aspecto, la presente invención se dirige al uso de un método de acuerdo con la invención para identificar *in vitro* si un paciente presenta una patología o tiene riesgo de desarrollar una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C, en donde este método comprende las siguientes etapas de:

- 25 a) obtener a partir del paciente que se va a someter a ensayo una muestra biológica que contiene tejido periférico que contiene células, tales como células de la piel y, opcionalmente, células sanguíneas;
- 30 b) determinar la tasa de edición para al menos una de las formas editadas o para la forma sin editar, de dicho ARNm de 5HTR2C y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de tejido periférico que contiene células, tales como células de la piel y, opcionalmente, células sanguíneas;
- 35 c) identificar si dicho paciente presenta o tiene riesgo de desarrollar una patología de ese tipo mediante la comparación de la tasa de edición obtenida en la etapa b) para esa forma editada o sin editar de dicho ARNm de 5HTR2C y/o mediante la comparación de la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de tejido periférico que contiene células, con tasas de edición de control características del ARNm de 5HTR2C o el perfil de ADARs expresadas, obtenido a partir de pacientes normales o a partir de pacientes que presentan patologías relacionadas con una alteración del mecanismo de esta edición de ARNm.

En una realización preferida, dicha patología se selecciona a partir del grupo que consiste en trastornos mentales, esquizofrenia, depresión, suicidio depresivo o conducta alimentaria anormal.

En un segundo aspecto, la invención se refiere al uso de un método de acuerdo con la invención para determinar *in vitro* si una patología mostrada por un paciente está relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C, en donde este método comprende las siguientes etapas de:

- 40 a) obtener a partir del paciente que muestra dicha patología, una muestra biológica que contiene tejido periférico que contiene células, tales como células de la piel y, opcionalmente, células sanguíneas;
- 45 b) determinar la tasa de edición para al menos una de las formas editadas o para la forma sin editar, de dicho ARNm de 5HTR2C y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de tejido periférico que contiene células, tales como células de la piel y, opcionalmente, células sanguíneas;
- 50 c) identificar si dicho paciente presenta o tiene riesgo de desarrollar una patología de ese tipo mediante la comparación de la tasa de edición obtenida en la etapa b) para esa forma editada o sin editar de dicho ARNm de 5HTR2C y/o mediante la comparación de la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de tejido periférico, con tasas de edición de control características del ARNm de 5HTR2C o el perfil de ADARs expresadas, obtenido a partir de pacientes normales o a partir de pacientes que muestran patologías conocidas por no estar relacionadas con una alteración del mecanismo de esta edición de ARNm.

En un aspecto general, la presente invención se dirige a:

- el uso de un método de acuerdo con la invención para identificar *in vitro* si un paciente presenta una patología o tiene riesgo de desarrollar una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición de un ARNm cuya edición es edición de A a I dependiente de ADAR en un mamífero;
- 5 – el uso de un método de acuerdo con la invención para identificar *in vitro* un agente que modula la edición de un ARNm cuya edición es edición de A a I dependiente de ADAR en un mamífero;
- el uso de un método de acuerdo con la invención para determinar *in vitro* en un paciente la eficacia de un fármaco utilizado para la prevención o para el tratamiento de una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición de un ARNm cuya edición es edición de A a I dependiente de ADAR en un mamífero;
- 10 – el uso de un método de acuerdo con la invención para determinar si un paciente responde o no responde a un tratamiento de una patología resultante o provocada por la alteración del mecanismo de edición de un ARNm cuya edición es edición de A a I dependiente de ADAR en un mamífero,

en donde este método comprende las siguientes etapas de:

- 15 a) obtener a partir del paciente que se va a someter a ensayo, una muestra biológica periférica que contiene células;
- b) determinar la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra biológica periférica;
- c) comparar la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra con un control característico del perfil de ADARs expresadas obtenido en pacientes normales o en pacientes que presentan patologías relacionadas con en la alteración del mecanismo de esta edición del ARNm.

20 En una realización preferida para estos métodos anteriores de la presente invención, dicho ARNm editado es un ARNm seleccionado a partir del grupo que consiste en el ARNm que codifica un receptor de glutamato de tipo AMPA, un receptor de serotonina acoplado a proteína G y PDEA8.

25 En un tercer aspecto, la invención se dirige al uso de un método de acuerdo con la invención para identificar *in vitro* un agente que modula *in vivo* la edición del ARNm de 5HTR2C en un mamífero, que comprende las siguientes etapas:

- a) administrar a dicho mamífero un modulador candidato de la edición del ARNm de 5HTR2C;
- b) obtener a partir de dicho mamífero una muestra biológica que contiene tejido periférico que contiene células, tales como células de la piel; y
- c) determinar los efectos de dicho modulador:
 - 30 – sobre la tasa de edición de al menos una de las formas editadas o sin editar de dicho ARNm de 5HTR2C; y/o
 - sobre la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de tejido periférico, tal como células de la piel y, opcionalmente, células de la sangre,

35 mediante la comparación de la tasa de edición para esta forma editada o sin editar y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas obtenidas a partir de la muestra biológica en la etapa b), con la tasa de edición y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas obtenidas a partir de un tejido periférico de control que contiene células de dicho mamífero.

40 En este tercer aspecto, la invención también comprende el uso de un método de acuerdo con la invención para la identificación *in vitro* de un agente que modula la edición del ARNm de 5HTR2C en un mamífero, que comprende las siguientes etapas de:

- a) obtener una muestra biológica que contiene tejido periférico de mamífero que contiene células, tal como una línea celular de la piel, opcionalmente, estas células pueden ser células recombinantes o líneas celulares;
- b) poner en contacto dicha muestra biológica en presencia de un modulador candidato de dicha edición del ARNm de 5HTR2C; y
- 45 c) determinar los efectos de dicho modulador:
 - sobre la tasa de edición de al menos una de las formas editadas o sin editar de dicho ARNm de 5HTR2C; y/o

- sobre la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de tejido periférico,

mediante la comparación de la tasa de edición para esta forma editada o sin editar y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas obtenidas a partir de la muestra biológica en la etapa b), con la tasa de la edición y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas obtenidas a partir de tejido periférico de control que contiene células, tales como células de la piel y, opcionalmente, células de la sangre de dicho mamífero.

En este tercer aspecto, la invención comprende también la implementación de estos métodos anteriores para detectar alteraciones de los procesos de regulación de la edición, inducidas mediante un tratamiento, tal como con antidepresivos, antipsicóticos, anti-obesidad, anti-infección vírica, tratamientos que han sido identificados por presentar una acción significativa sobre la regulación de la edición en el cerebro y desencadenar riesgos identificados como el suicidio, la resistencia a un tratamiento, la cronicidad inducida.

En un cuarto aspecto, la invención comprende el uso de un método de acuerdo con la invención para determinar *in vitro* en un mamífero la eficacia de un fármaco utilizado para la prevención o para el tratamiento de una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C, que comprende las siguientes etapas de:

a) obtener a partir de dicho mamífero una muestra biológica que contiene tejido periférico que contiene células, tales como células de la piel y, opcionalmente, células sanguíneas, y determinar la tasa de edición para al menos una de las formas editadas o para la forma sin editar, de dicho ARNm de 5HTR2C y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de tejido periférico, tal como en células de la piel y, opcionalmente, células sanguíneas;

b) administrar a dicho mamífero el fármaco destinado a la prevención o al tratamiento de una patología;

c) obtener a partir de dicho mamífero durante y/o después del tratamiento una nueva muestra de dicha muestra de tejido periférico y determinar la tasa de edición para al menos una de las formas editadas o para la forma sin editar, de dicho ARNm de 5HTR2C, y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra seleccionada en la etapa a); y

d) determinar la eficacia de dicho fármaco mediante la comparación de la tasa de edición y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas, obtenida a partir de la muestra biológica en la etapa a) con la obtenida en la etapa c), en donde una modulación de la tasa de edición y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas que da como resultado una tasa de edición y/o una naturaleza y/o una cantidad de las ADARs expresadas próxima o igual a la observada para pacientes normales, es significativa de la eficacia del tratamiento.

En este aspecto, la presente invención se refiere al uso de un método de acuerdo con la invención para determinar si un paciente responde o no responde a un tratamiento de una patología resultante o provocada por la alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C, que comprende además unas etapas de:

e) determinar si el paciente responde o no responde al tratamiento mediante la observación de la modificación de la o las tasas o perfil de edición y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas después de un período de tratamiento (es decir, 15 días, 30 días, 2 meses, 6 meses, etc.) mediante una comparación con la o las tasas o el perfil de edición y/o la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas antes del comienzo del tratamiento.

Un método de este tipo permite evitar extender innecesariamente el período de tratamiento con un fármaco si se puede determinar rápidamente, por lo tanto, que el paciente no responde a dicho fármaco, o para continuar el tratamiento, si el paciente responde a ese fármaco.

La edición es el mecanismo por el cual la información contenida en el gen se modifica después de la transcripción. La expresión general "edición de ARNm" incluye la modificación de la secuencia de los ARNm que da como resultado un cambio, en términos de naturaleza o cantidad, en los aminoácidos incorporados en la proteína durante la traducción, sin que pueda ser ya posible deducir la secuencia de la proteína a partir de la del gen que dirige su síntesis. El ARN premensajero de 5HTR2C se puede someter a una modificación enzimática específica de ciertas adenosinas (A), en la porción que se convertirá en el ARNm definitivo que dirige la incorporación de los aminoácidos ubicados en el segundo bucle intracelular de 5HTR2C. De hecho, la parte distal del quinto exón y la parte proximal del quinto intrón del transcrito primario son capaces de formar una estructura de tallo-bucle que es reconocida potencialmente por dos enzimas, ADAR1 y ADAR2 (desaminasa de adenosina dependiente de ARN de doble cadena), lo que hace posible la edición del ARN premensajero antes del corte y empalme. Esta edición se produce mediante la desaminación de las As, que luego se convierten en inosina (I). Una vez que se ha completado el corte y empalme, la parte del ARNm que contenía las As que se habían sometido a edición, ahora contiene Is. Cuando se traduce el ARNm de 5HTR2C, se cree que las Is se leen como Gs. De hecho, durante la síntesis *in vitro* del ADNc procedente del ARNm de 5HTR2C que ha sufrido la desaminación de As en Is, la transcriptasa inversa incorpora dCs frente a las Is, en lugar de dTs, que normalmente deberían haber sido incorporadas frente a las As. En consecuencia, durante la síntesis de la segunda cadena que da lugar a la formación del ADNc de doble cadena, se

introduce una dG frente a cada dC incorporada en la primera cadena. La secuenciación del ADNc de doble cadena obtenido de esta manera hace que sea posible la observación de la sustitución de las dAs por dGs, debido a la desaminación inicial de las As en Is en el ARNm que se sometió a edición. En consecuencia, la edición del ARNm produce una modificación del significado de los codones en los que las As se han sustituido por Is, que se cree por tanto que se leen como Gs (más específicamente, en relación con la edición de 5HTR2C, véase Fitzgerald et al., Neuropsychopharmacology, 1999, 21(2S), 82S-90S).

Por lo tanto, la determinación de una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C mediante el control de la tasa de edición en una muestra de la piel, también es significativa de una alteración de la ruta de múltiples etapas y metabólica del sistema serotoninérgico expresado en la piel y que se podría utilizar como un informador del sistema serotoninérgico expresado en el cerebro.

Por lo tanto, en un sexto aspecto, la presente invención también comprende un método para controlar la alteración del mecanismo de acción de proteínas que están implicadas en la edición del ARNm de 5HTR2C, como las enzimas ADAR1 y/o ADAR2, mediante la determinación de la tasa de edición de este ARNm de 5HTR2C a partir de un tejido periférico que contiene células, tal como una muestra de piel u, opcionalmente, una muestra de sangre, mediante el método para la determinación de la o las tasas de edición de las formas editadas o sin editar de dicho ARNm de 5HTR2C, tal como se implementa o se describe en los métodos anteriores, de acuerdo con la presente invención.

Es importante señalar que la presente invención se dirige a la utilización de marcadores periféricos del proceso de edición para diagnosticar y hacer un seguimiento de las alteraciones generales de su regulación con una implicación predecible en patologías que alteran el cerebro y/o funciones periféricas. El objetivo principal es, a modo de ejemplo no exclusivo, conseguir a una nueva capacidad para predecir y orientar la terapia en pacientes, en los que se ha sugerido que una alteración de la regulación de la edición participa en su patología (por ejemplo, como en la depresión y el suicidio), bien después de observaciones post mortem convergentes o por una evidencia clínica indirecta (por ejemplo, como un estado depresivo inducido por un tratamiento con interferón) (véase en particular el Ejemplo 1 para la estrategia implementada para ese objetivo).

La expresión "ARN editado" se entiende que indica, en la presente descripción, cualquier secuencia de ARN en la que al menos una adenosina se ha desaminado a inosina a través de una desaminasa de adenosina.

Por "tasa de edición", se entiende el porcentaje de cada una de las formas editadas y no editadas del ARNm que pueden comprender al menos un sitio de edición, con respecto a la cantidad total de las formas editadas o sin editar de ARNm presentes en dicha misma muestra.

Sitios de edición	A B	EC	D	
1 5HTR2C-0 I-N-I	ATACGTAATCCTATT			SEQ ID No. 1
2 5HTR2C-A V-N-I	ITACGTAATCCTATT			SEQ ID No. 2
3 5HTR2C-B M-N-I	ATICGTAATCCTATT			SEQ ID No. 3
4 5HTR2C-C I-S-I	ATACGTAITCCTATT			SEQ ID No. 4
5 5HTR2C-D I-N-V	ATACGTAATCCTITT			SEQ ID No. 5
6 5HTR2C-E I-D-I	ATACGTIATCCTATT			SEQ ID No. 6
7 5HTR2C-AB V-N-I	ITICGTAATCCTATT			SEQ ID No. 7
8 5HTR2C-AC V-S-I	ITACGTAITCCTATT			SEQ ID No. 8
9 5HTR2C-AD V-N-V	ITACGTAATCCTITT			SEQ ID No. 9
10 5HTR2C-AE V-D-I	ITACGTIATCCTATT			SEQ ID No. 10
11 5HTR2C-BC	ATICGTAITCCTATT			SEQ ID No. 11

ES 2 646 592 T3

	M-S-I		
12	5HTR2C-BD	ATICGTAATCCTITT	SEQ ID No. 12
	M-N-V		
13	5HTR2C-BE	ATICGTIATCCTATT	SEQ ID No. 13
	M-D-I		
14	5HTR2C-CD	ATACGTAITCCTITT	SEQ ID No. 14
	I-S-V		
15	5HTR2C-CE	ATACGTIITCCTATT	SEQ ID No. 15
	I-G-I		
16	5HTR2C-DE	ATACGTIATCCTITT	SEQ ID No. 16
	I-D-V		
17	5HTR2C-ABC	ITICGTAITCCTATT	SEQ ID No. 17
	V-S-I		
18	5HTR2C-ABD	ITICGTAATCCTITT	SEQ ID No. 18
	V-N-V		
19	5HTR2C-ABE	ITICGTIATCCTATT	SEQ ID No. 19
	V-D-I		
20	5HTR2C-ACD	ITACGTAITCCTITT	SEQ ID No. 20
	V-S-V		
21	5HTR2C-ACE	ITACGTIITCCTATT	SEQ ID No. 21
	V-G-I		
22	5HTR2C-ADE	ITACGTIATCCTITT	SEQ ID No. 22
	V-D-V		
23	5HTR2C-BCD	ATICGTAITCCTITT	SEQ ID No. 23
	M-S-V		
24	5HTR2C-BCE	ATICGTIITCCTATT	SEQ ID No. 24
	M-G-I		
25	5HTR2C-BDE	ATICGTIATCCTITT	SEQ ID No. 25
	M-D-V		
26	5HTR2C-CDE	ATACGTIITCCTITT	SEQ ID No. 26
	I-G-V		
27	5HTR2C-ABCD	ITICGTAITCCTITT	SEQ ID No. 27
	V-S-V		
28	5HTR2C-ABCE	ITICGTIITCCTATT	SEQ ID No. 28
	V-G-I		
29	5HTR2C-ABDE	ITICGTIATCCTITT	SEQ ID No. 29
	V-D-V		
30	5HTR2C-ACDE	ITACGTIITCCTITT	SEQ ID No. 30
	V-G-V		
31	5HTR2C-BCDE	ATICGTIITCCTITT	SEQ ID No. 31
	M-G-V		
32	5HTR2C-ABCDE	ITICGTIITCCTITT	SEQ ID No. 32
	V-G-V		

* El sitio de edición "E" también se denomina "C"

En una realización preferida de los métodos de acuerdo con la invención, el paciente o el mamífero es un ser humano, un ratón o una rata, preferiblemente un ser humano.

En una realización preferida de los métodos de acuerdo con la invención, las células de la piel se seleccionan a partir del grupo que consiste en queratinocitos, melanocitos, fibroblastos, células de Langerhans y células de Merkel, y el tejido de la piel se selecciona a partir del grupo que consiste en epidermis y dermis.

5 Los queratinocitos pueden proceder de células humanas inmortalizadas, tales como la línea celular HaCaT, o los melanocitos proceden de células humanas inmortalizadas o un melanoma.

En una realización preferida de los métodos de acuerdo con la invención, los queratinocitos son neonatales para la piel, dermis o folículos pilosos, los melanocitos son de la epidermis o folículos pilosos, y los fibroblastos son de la dermis o folículos pilosos papilares.

10 En una realización más preferida de los métodos de acuerdo con la invención, las células de la piel, las células obtenidas a partir de cultivos de piel o tejido de la piel, son del párpado o la piel auricular.

En una realización preferida de los métodos de acuerdo con la invención, los sitios de edición de dichos ARNm de 5HTR2C se seleccionan a partir de los nucleótidos localizados en la posición 1, 3, 7, 8 y 13 del fragmento de ARNm de 5HTR2C humano que tiene la secuencia 5' -AUA CGU AAU CCU AUU-3' (SEQ ID No. 33).

15 En una realización preferida de los métodos de acuerdo con la invención, la tasa de edición se determina para al menos 1, preferiblemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 32 de las formas editadas y no editadas de ARNm de 5HTR2C humano.

En una realización más preferida, la tasa de edición se determina para todas las formas editadas y no editadas de dicho ARNm de 5HTR2C (32 formas).

20 En una realización preferida de los métodos de acuerdo con la invención, la tasa de edición para cada forma editada y sin editar de dicho ARNm de 5HTR2C se determina mediante un método que comprende las siguientes etapas:

A) extracción de los ARNs totales de dicha muestra de células de la piel, tal como una línea de células de la piel, células cultivadas obtenidas a partir de la piel o tejido de la piel u, opcionalmente, de dichas células de la sangre, tales como glóbulos blancos, seguida, en su caso, de una purificación de los ARNm;

B) transcripción inversa de los ARNs extraídos en la etapa A); y

25 C) amplificación con PCR de los ADNc obtenidos en la etapa B), usando al menos una pareja de cebadores específicos para el fragmento de ARNm de 5HTR2C que contiene los sitios de edición que se pueden editar, en donde esta pareja de cebadores se selecciona de forma que sea capaz de amplificar todas las formas de edición y la forma sin editar potencialmente presentes en el extracto de ARN.

30 En una realización más preferida de los métodos de acuerdo con la invención, la tasa de edición para cada forma editada y sin editar de dicho ARNm de 5HTR2C se determina mediante un método que comprende las siguientes etapas:

A) extracción de los ARNs totales de dicha muestra de células de la piel, tal como una línea de células de la piel, células cultivadas obtenidas a partir de la piel o tejido de la piel u, opcionalmente, de dicha muestra de células de la sangre, tales como glóbulos blancos, seguida, en su caso, de una purificación de los ARNm;

35 B) transcripción inversa de los ARNs extraídos en la etapa A); y

C) amplificación con PCR de los ADNc obtenidos en la etapa B), usando al menos una pareja de cebadores específicos para el fragmento de ARNm de 5HTR2C que contiene los sitios de edición que se pueden editar, en donde esta pareja de cebadores se selecciona de forma que sea capaz de amplificar todas las formas de edición y la forma sin editar potencialmente presentes en el extracto de ARN.

40 En una realización más preferida de la etapa B), el cebador oligonucleotídico específico del gen 5HTR2C tiene la secuencia 5'-TTCGTCCCTCAGTCCAATCAC-3' (SEQ ID No. 34).

45 En una realización preferida de los métodos de acuerdo con la invención, en la etapa C), la etapa de amplificación con PCR es una PCR de tipo anidada que comprende dos ciclos de PCR, y en donde el primer ciclo de PCR se lleva a cabo mediante un conjunto de cebadores que producen un producto de ácido nucleico de la PCR que tiene una longitud comprendida entre 200 pb y 300 pb, preferentemente entre 225 pb y 275 pb, más preferentemente entre 240 pb y 260 pb, 250 pb es la más preferida.

50 En una realización más preferida de los métodos de acuerdo con la invención en la etapa C), la etapa de amplificación con PCR es una PCR de tipo anidada que comprende dos ciclos de PCR, y en donde el segundo ciclo de PCR se lleva a cabo mediante un conjunto de cebadores que producen un producto final de ácido nucleico de la PCR que tiene una longitud comprendida entre 90 pb y 160 pb, preferentemente entre 100 pb y 140 pb, más preferentemente entre 110 pb y 140 pb. Un producto final de la PCR que tiene una longitud de secuencia entre 110 pb y 138 pb es el más preferido.

En una realización aún más preferida de los métodos de acuerdo con la invención, en la etapa C), la etapa de amplificación con PCR es una PCR de tipo anidada que comprende dos ciclos de PCR, y en donde el primer ciclo de PCR se lleva a cabo con el siguiente conjunto de cebadores:

para ser humano:

- 5 PCR9 Directo: 5'-TGTCCCTAGCCATTGCTGATATGC-3', SEQ ID No. 35;
 PCR10 Inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3', SEQ ID No. 36; y

para ratón o rata:

- PCR9 Directo: 5'-TGTCCCTAGCCATTGCTGATATGC-3', SEQ ID No. 35;
 PCR10 Inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3', SEQ ID No. 36,

- 10 en donde el segundo ciclo de PCR se lleva a cabo con el siguiente conjunto de cebadores:

para ser humano:

- PCR18 Directo: 5'-ATGTGCTATTTTCAACAGCGTCCATC-3', SEQ ID No. 37;
 PCR2 Inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTA-3', SEQ ID No. 38; y

para ratón o rata:

- 15 PCR1 Directo: 5'-TTTGTGCCCGTCTGGAT-3', SEQ ID No. 39;
 PCR4 Inverso: 5'-GCCTTAGTCCGCGAATTG-3', SEQ ID No. 40.

Los dos conjuntos de cebadores siguientes utilizados para amplificar mediante una PCR anidada todas las isoformas del ARNm de 5HTR2C editado humano y sin editar humano, se incluyen en la presente invención, preferiblemente, el conjunto de cebadores usados para la segunda de las PCR:

- 20 primer ciclo:

- PCR9 Directo: 5'-TGTCCCTAGCCATTGCTGATATGC-3' (SEQ ID No. 35);
 PCR10 Inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3' (SEQ ID No. 36); y

segundo ciclo:

- PCR18 Directo: 5'-ATGTGCTATTTTCAACAGCGTCCATC-3' (SEQ ID No. 37);
 25 PCR2 Inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTA-3' (SEQ ID No. 38).

Los cebadores usados en la etapa de amplificación con PCR si hay un ciclo de PCR, o usados en el segundo ciclo si es una PCR de tipo anidada que tiene dos ciclos de PCR, se marcan preferentemente, más preferiblemente se marcan con fluoróforos, tales como C6-FAM (MWG) o VIC (Applied Biosystem).

- 30 En una realización también más preferida de los métodos de acuerdo con la invención, la tasa de edición para cada forma editada y sin editar de dicho ARNm de 5HTR2C, se determina mediante un método SSCP capaz de proporcionar el perfil de edición para cada una de las formas distintas editadas y sin editar de dicho ARNm, en donde dicho método SSCP se caracteriza porque después de las etapas A), B) y C), comprende las siguientes etapas:

D) en su caso, purificación de los productos de la PCR obtenidos en la etapa C);

- 35 E) en su caso, cuantificación de los productos de la PCR obtenidos en la etapa D);

F) disociación de los ADNs de doble cadena en ADNs de cadena sencilla, en particular mediante calentamiento seguido de enfriamiento brusco;

G) separación de los ADNs de cadena sencilla mediante electroforesis capilar; y

- 40 H) obtención del perfil de edición mediante lectura de la fluorescencia y, en su caso, adquisición de los datos del perfil por medio del sistema de explotación asociado con el lector de fluorescencia.

La obtención del perfil de migración electroforética de los diversos ADNs monocatenarios correspondientes a la forma editada diversa del fragmento de ADNc de 5HTR2C que contiene los cinco sitios de edición, se denomina en este documento "perfil de edición".

5 En una realización preferida, las tasas de edición o los perfiles de edición control o estándar del ARNm de 5HTR2C utilizados en la etapa c) de las reivindicaciones 1 a 4 para la determinación del riesgo de una patología, la patología asociada a la alteración de la edición del ARNm de 5HTR2C o el efecto del agente sometido a ensayo, son tasas o perfiles de edición característicos obtenidos para cada una de las distintas formas editadas y sin editar de dicho ARNm con el mismo método y en las mismas condiciones dadas, utilizadas para la muestra biológica sometida a ensayo.

10 De una manera general, la calidad y/o la cantidad de cada forma editada y sin editar distinta, presente en la muestra biológica que se va a someter a ensayo, se puede evaluar mediante una comparación con las tasas o los perfiles de edición de mezclas cualitativas y/o cuantitativas conocidas de cada una de estas formas editadas y sin editar, obtenidas con el mismo método, tal como el método SCCP descrito anteriormente, y en las mismas condiciones utilizadas para la muestra biológica sometida a ensayo.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un ácido nucleico aislado, en donde este ácido nucleico:

- 15 – comprende o tiene la secuencia ATGTGCTATTTTCAACAGCGTCCATC (SEQ ID No. 37) y, preferiblemente, tiene como máximo 100 nucleótidos, más preferiblemente 90, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 29, 28, 27 y 26 nucleótidos; o
- comprende el fragmento nt5-nt14 de SEQ ID No. 37, preferiblemente el fragmento nt4-nt14, nt3-nt14, nt2-nt14, nt1-nt14, nt5-nt15, nt5-nt16, nt5-nt17, nt5-nt16, nt5-nt17, nt5-nt18, nt5-nt19, nt5-nt20, nt5-nt21, nt5-nt22, nt5-nt23, nt5-nt24, nt5-nt25 de SEQ ID No. 37.

20 En una realización adicional, el ácido nucleico aislado de acuerdo con la invención se marca, preferiblemente con un fluoróforo.

En este aspecto, la presente invención comprende el uso de dicho ácido nucleico de acuerdo con la invención como un cebador o una sonda, preferentemente como un cebador en un método de amplificación con PCR, más preferiblemente en una PCR anidada como un segundo cebador.

25 La presente invención se refiere a un kit para la determinación de una tasa o perfil de edición del ARNm de 5HTR2C de mamífero, preferiblemente en seres humanos, en rata o en ratón, más preferiblemente en seres humanos, en donde dicho kit contiene un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

En una realización preferida de los métodos de la presente, las células que se seleccionan para determinar en asociación la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas, son glóbulos blancos de la sangre o leucocitos o proceden de la capa leucocitaria de una muestra de sangre completa obtenida después de una centrifugación.

30 En una realización preferida, en la etapa b), los productos de la expresión de ADAR son ADAR1, isoformas 150 y/o 110, y los productos de la expresión génica de ADAR2, preferiblemente los productos de expresión del gen de ratón, rata o ser humano que codifica ADAR1, las isoformas proteicas de 150 kD y/o 110 kD, y la proteína ADAR2. El ser humano es el más preferido.

35 La secuencia nucleica del ARNm de ADAR1 que codifica las isoformas proteicas de 150 kD y 110 kD, y la secuencia nucleica del ARNm de ADAR2 que codifica la proteína ADAR2 y su secuencia de aminoácidos, son bien conocidas por una persona experta, para el ser humano, ratón o rata.

Por ejemplo, se pueden citar particularmente las siguientes secuencias descritas en Genbank con el número de orden:

para ADAR1:

- 40 – para ser humano NM_001111.3; NM_001025107.1,
- para ratón: NM_019655.2; NM_001038587.2,

para ADAR2:

- para ser humano: NM_001112.2; NM_015833.2; NM_015834.2 y NM_001033049.1,
- para ratón: NM_130895.2; NM_001024837; 1NM_001024838.1; NM_001024840.1 y NM_001024839.1.

45 En una realización adicional preferida, en la etapa b), los productos de expresión de ADAR son los ARNm de ADAR.

Por tanto, la presente invención se dirige a un método de acuerdo con la invención, en donde en la etapa b), la determinación del ARNm de ADAR se lleva a cabo mediante un método que comprende las siguientes etapas:

- A) extracción de los ARNs totales de dichas células de la muestra de piel y, opcionalmente, células de la muestra de sangre, seguida, en su caso, por una purificación de los ARNm;

B) transcripción inversa de los ARNs extraídos en la etapa A) a través de un cebador oligo dT; y

C) amplificación con PCR de los ADNc obtenidos en la etapa B), usando al menos una pareja de cebadores específicos para cada uno de los ARNm de ADAR que se van a cuantificar y/o analizar cualitativamente.

5 En una realización preferida, la pareja de cebadores específicos para la amplificación con PCR del ARNm de ADAR se selecciona a partir del grupo que consiste en:

– para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-150 humana:

EX1A 34p Directo: 5'-GCCTCGCGGGCGCAATGAATCC-3' (SEQ ID No. 41),

EX2 578m Inverso: 5'-CTTGCCCTTCTTTGCCAGGGAG-3' (SEQ ID No. 42);

– para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-110 humana:

10 EX1B 534p Directo: 5'-CGAGCCATCATGGAGATGCCCTCC-3' (SEQ ID No. 43),

EX2 804m Inverso: 5'-CATAGCTGCATCCTGCTTGGCCAC-3' (SEQ ID No. 44);

– para la amplificación del ARNm de ADAR2 humana:

ADAR2 1274p Directo: 5'-GCTGCGCAGTCTGCCCTGGCCGC-3' (SEQ ID No. 45),

ADAR2 1486m Inverso: 5'-GTCATGACGACTCCAGCCAGCAC-3' (SEQ ID No. 46);

15 – para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-150 de ratón:

EX1A 19p Directo: 5'-GTCTCAAGGGTTCAGGGGACCC-3' (SEQ ID No. 47),

EX2 646m Inverso: 5'-CTCCTCTAGGGAATTCCTGGATAC-3' (SEQ ID No. 48);

– para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-110 de ratón:

EX1B 72p Directo: 5'-TCACGAGTGGGCAGCGTCCGAGG-3' (SEQ ID No. 49),

20 EX2 646m Inverso: 5'-CTCCTCTAGGGAATTCCTGGATAC-3' (SEQ ID No. 48); y

– para la amplificación del ARNm de ADAR2 de ratón:

EX7 1281p Directo: 5'-GCTGCACAGTCTGCCTTGGCTAC-3' (SEQ ID No. 50),

EX9 1622m Inverso: 5'-GCATAAGAAACCTGAGCAGGGAC-3' (SEQ ID No. 51).

25 En un segundo aspecto del método de acuerdo con la presente invención, en la etapa b), los productos de expresión de ADAR son las proteínas ADAR.

Por lo tanto, en una realización preferida de este método, la determinación de las proteínas ADAR se lleva a cabo mediante un método que comprende las siguientes etapas:

30 A) opcionalmente, la extracción de las proteínas totales contenidas en dichas células de la muestra de piel y, opcionalmente, células de la muestra de sangre, seguida, en su caso, por una etapa de purificación de proteínas; y

B) la determinación de la presencia, la naturaleza y/o la concentración de cada proteína ADAR contenida en dichas células de la muestra de piel y, opcionalmente, células de la muestra de sangre, mediante la implementación de anticuerpos capaces de reconocer específicamente dichas proteínas ADAR, preferiblemente anticuerpos marcados.

35 Entre estos anticuerpos que se pueden usar para esta detección y/o cuantificación, se pueden citar los siguientes anticuerpos, pero que no se limitan a:

sc-33179 anticuerpo policlonal anti-ADAR1 (H-176) (Santa Cruz); o

sc-33180 anticuerpo policlonal anti-ADAR2 (H-90) (Santa Cruz).

40 La transferencia Western o un método de ELISA se pueden emplear para analizar o cuantificar la expresión de proteínas específicas en la muestra biológica. Tales métodos son bien conocidos por la persona experta.

Las transferencias se pueden detectar usando anticuerpos dirigidos específicamente contra diferentes regiones o

epítomos específicos de la proteína ADAR1-150 o ADAR1-110 y ADAR2 de ratón, ser humano o rata. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales y, si es necesario, están marcados. Tales anticuerpos se pueden desarrollar en un laboratorio usando proteína ADAR recombinante o un fragmento de la misma como inmunógeno.

- 5 Los siguientes ejemplos y también las figuras y las leyendas de aquí en adelante han sido seleccionados para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa con el fin de que sean capaces de implementar y usar la presente invención. Estos ejemplos no están destinados a limitar el alcance de lo que el inventor considera que es su invención, ni pretenden mostrar que solo se llevaron a cabo los experimentos siguientes.

Leyendas de las figuras

- 10 **Figura 1:** Media (línea negra) de señales de SSCP electroforéticas calculada a partir de cada señal de la corteza cingulada anterior individual de un grupo de controles de sujetos humanos (datos experimentales). La curva correspondiente a la media + SEM de estas señales también se presenta (línea verde). El eje de abscisas representa la base de tiempo de 10000 puntos (6,2 puntos/segundo) y las ordenadas se proporcionan en unidades arbitrarias de fluorescencia después de una normalización de la señal total. La señal presentada se corresponde a las cadenas marcadas con FAM (parte izquierda) y VIC (parte derecha). Algunos ejemplos típicos de señales de electroforesis obtenidas con estándares individuales, se presentan como negativos en su marcado correspondiente con FAM y VIC. En las partes izquierda y derecha de la figura, las tablas presentan, aplicadas a un tiempo base único, las posiciones de los diferentes picos de electroforesis principales (máximo) de cada cadena individual estándar de una isoforma editada particular marcada con sondas de FAM (izquierda) o VIC (derecha). Dos máximos de picos identificados se podían separar cuando su intervalo era ≥ 15 puntos del tiempo base definido anteriormente. Téngase en cuenta que algunos picos no resueltos del patrón electroforético de una cadena marcada, se resuelven a partir de la otra (estos casos se identifican por el mismo color).

- 25 **Figuras 2A y 2B:** Identificación de los transcritos de 5-HT2cR en piel humana y de ratón. (A) Los ADNc preparados a partir de ARNs poliA+ de párpado humano (carriles 1-3) se amplificaron con un primer ciclo de PCR usando los dos cebadores específicos PCR9 y PCR10. A continuación, se llevó a cabo una PCR anidada sobre estos primeros productos con los cebadores PCR18 y PCR2 (carriles 6-8). Los productos resultantes se determinaron en un gel de agarosa al 2%. Los tamaños esperados de los productos de la amplificación tienen una longitud de 250 pb y 127 pb para la primera y la segunda PCR, respectivamente. Los controles negativos (carriles 4 y 9) y positivos (carriles 5 y 10) se muestran para cada conjunto de cebadores. Un marcador del tamaño del peso molecular del ADN de 100 pb se indica con M. (B) Los ADNc preparados a partir de ARNs poliA+ de piel de ratones Balb/c se amplificaron mediante un primer ciclo de PCR usando los dos cebadores específicos de genes PCR9 y PCR10 (carriles 1-6). A continuación, se realizó una segunda PCR sobre estas primeras amplificaciones con los cebadores PCR1 y PCR4 (carriles 9-14). Los controles negativos (carriles 7 y 15) y positivos (carriles 8 y 16) se muestran para cada conjunto de cebadores. Los productos resultantes se determinaron en un gel de agarosa al 2%. Los tamaños esperados de los productos de la amplificación tienen una longitud de 250 pb y 138 pb para la primera y la segunda PCR, respectivamente. M es para el marcador del tamaño del peso molecular de ADN de 100 pb.

- 40 **Figuras 3A y 3B:** Los ARNm de las isoenzimas ADARs están claramente identificados en la sangre y la piel de ratones Balb/c. (A) Los ADNc preparados a partir de ARN de sangre completa (carril 4) y ARN de la piel (carriles 1-3, correspondientes a 3 tiempos diferentes de la transcripción inversa, es decir, 30 min, 2 h y 4 h, respectivamente) se amplificaron por PCR con cebadores específicos para la forma constitutiva (p110) e inducible de ADAR1 (p150). Los productos de la amplificación resultantes resueltos en un gel de agarosa al 2% tienen una longitud de 674 pb (isoforma p150) y 683 pb (isoforma p110), respectivamente. Se muestran controles negativos (carril 5) y el marcador del tamaño del peso molecular de ADN de 100 pb (M). El contraste potenciado permite la detección de una banda débil correspondiente a la forma constitutiva de ADAR1, transcrita en células de sangre completa (carril 4, p110). (B) Lo mismo que en (A), pero se presentan amplificaciones con PCR correspondiente a transcritos de ADAR2 en piel y sangre completa. Los productos de la PCR tienen una longitud de 366 pb. Una vez más, se observa una banda muy débil correspondiente a la forma constitutiva de ADAR1 en sangre completa (carril 4, p110).

- 50 **Figuras 4A y 4B:** Identificación de transcritos de ADAR 1 inducible en leucocitos humanos. (A) ADNc preparados a partir de ARN total de leucocitos de sangre periférica humana (carril 10) y a partir de genotecas normalizadas de fracciones de sangre humana (carriles 1-9) se amplificaron por PCR con cebadores específicos para la forma inducible de ADAR1 (p150). Los productos resultantes se determinaron en un gel de agarosa al 2%. El tamaño esperado del producto de la amplificación es de 544 pb de longitud. Los carriles 1 y 6; 2 y 7; 3 y 8 se corresponden con células mononucleares en reposo y activadas, células CD4+ en reposo y activadas, y CD8+ en reposo y activadas, respectivamente. Carril 4 y 5: células CD14+ y CD19+ en reposo. Carril 9: células CD19+ activadas. Carril 11: ADNc de placenta humana utilizado como control. El marcador del tamaño del peso molecular de ADN de 100 pb se indica con M. Se muestran controles positivos de PCR (cebadores G3PDH con ADNc de placenta humana, carril 13) y controles negativos de PCR (carril 12). (B) Duplicado de (A). Los carriles 1-9 son equivalentes a los carriles 1-9 de (A). Carril 10: ADNc de placenta humana.

- 60 **Figuras 5A y 5B:** Identificación de transcritos de ADAR1 p110, ADAR1 p150 y ADAR2 en la corteza prefrontal dorsal humana, células de la piel y de la sangre CD4+ y CD8+. (A) Los ADNc de genotecas normalizadas de

fracciones de sangre humana CD4+ y CD8+ (carriles 1 y 2); preparado a partir de ARN total de DPFC (carriles 3 y 4) y de ARN poliA+ de párpado humano (carril 5) se amplificaron mediante PCR usando los dos conjuntos específicos de cebadores EX1B 534p/EX2 804m y EX1A 34p/EX2 578m para ADAR1 p110 y ADAR1 p150, respectivamente. Los productos resultantes se determinaron en un gel de agarosa al 1,75%. Los tamaños esperados de los productos de amplificación son 270 pb (ADAR1 p110) y 566 pb (ADAR1 p150). Se muestran controles negativos (carril 6) y controles positivos (carril 7, ADNc de placenta humana) para cada conjunto de cebadores. Un marcador del tamaño del peso molecular de ADN de 100 pb se indica con M. (B) Los mismos ADNc que en A) se amplificaron por PCR usando los dos conjuntos específicos de genes, de cebadores ADAR2 1274p/ADAR2 1486m y G3PDH-F/G3PDH-R para ADAR2 y G3PDH (control positivo), respectivamente. Los productos resultantes se determinaron en un gel de agarosa al 1,75% negativo. El tamaño esperado para ADAR2 es de 212 pb de longitud.

Figuras 6A-6C: Evolución de la concentración de ADAR1 un ARNm específico, medido por QPCR en la corteza prefrontal (figura 6A), piel (figura 6B) y sangre (figura 6C) de la muestra después de una inyección IP única de interferón alfa2A de ratón en t cero (20000 UI). El efecto se expresa como el nº de veces de aumento desde el valor del control normalizado a 1. * p <0,05.

Ejemplo 1: Estrategia implementada

La validación de una estrategia de este tipo ha implicado:

- 1) La identificación de una alteración significativa del proceso de edición en el cerebro humano en una patología dada y la validación de su implicación patógena en la patología mediante observaciones post mortem realizadas en modelos patológicos convergentes obtenidos en ratón y/o rata.
- 2) La identificación de tejidos periféricos o líneas celulares de fácil acceso a nivel no invasivo que podrían ser utilizados para el ajuste diagnóstico y terapéutico.

En la presente invención se obtuvo la validación de esta estrategia mediante:

A - La medición de marcadores adecuados del proceso de edición en toda o parte de la regulación de la edición implicada: perfiles de edición del ARNm de 5-HT2cR, marcadores de la expresión de las diferentes isoformas de las enzimas de edición: ADAR1-150, ADAR1-110, ADAR2.

A modo de ejemplo de los resultados obtenidos para validar la presente invención, la tabla I determina el conjunto de marcadores que se proponen después de su identificación en las fuentes propuestas procedentes de sujetos humanos y animales de experimentación o líneas celulares:

Tabla 1: Nivel de expresión de 5HT2cR y las enzimas de edición. Observamos que en las muestras de sangre el nivel de expresión de las enzimas de edición se puede determinar fácilmente. En muestras de piel, el 5-HT2cR se expresa y se remite a la actividad de edición de las ADARs 1 y 2, y puede completar la investigación del estado general de la regulación de la edición de este receptor en las muestras de cerebro.

		Cerebro	Piel	Sangre
5-HT2cR				
Ratón (Balb/c)		+++	+	0
			Editado mediante ADARS1 y 2	
Ser humano		+++	+	0
			Editado mediante ADARS1 y 2	
ADARs				
Ratón	ADAR1-150	++	+++	++
	ADAR1-110	++	+++	+
	ADAR2	++	++++	++
Ser humano	ADAR1-150	++	**	++
	ADAR1-110	++	**	**

	ADAR2	+	**	**

Para cada marcador, las muestras se extraen rápidamente con especial cuidado para permitir la posibilidad de ejecutar la determinación de los niveles de expresión del ARNm, los perfiles de edición y la determinación de marcadores de proteínas mediante transferencia Western, a partir de la misma muestra de tejido o célula.

- 5 La tabla 2 resume los procedimientos preferidos utilizados para la determinación del nivel de expresión de los biomarcadores utilizados.

Tabla 2

	5-HT2cR (ratón)	5-HT2cR (Hum)	ADAR1 p110 (ratón)	ADAR1 p150 (ratón)	ADAR2 (ratón)	ADAR1 p110 (Hum)	ADAR1 p150 (Hum)	ADAR2 (Hum)
ARN	poliA+ o Total	poliA+ o Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total
Digestión con ADNasa	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
Cebador RT	5-HT2cR-oligo6-RT	5-HT2cR-oligo6-RT	oligo(dT)20	oligo(dT)20	oligo(dT)20	oligo(dT)20	oligo(dT)20	oligo(dT)20
Tratamiento con ARNasaH	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
PCR1	PCR9/PCR10	PCR9/PCR10	EX1B 72p / EX2 646m	EX1A 19p / EX2 646m	EX7 1281p / EX9 1622m	EX1B 534p / EX2 804m	EX1A 34p / EX2 578m	ADAR2 1274p / ADAR21486m
PCR2	PCR1/PCR4	PCR2/PCR18						

Los siguientes ejemplos ilustran el procedimiento típico y los resultados.

Ejemplo 2: Obtención del perfil de edición completo de una muestra de tejido cerebral (figura 1)

El ARN total fue extraído y purificado a partir de extractos de tejidos o de células, de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Qiagen RNeasy, Mini Kit). La cantidad y la pureza del ARN extraído se evaluaron midiendo tanto la absorbancia a 260 nm como la relación 260/280 nm con un espectrofotómetro GeneQuant (PharmaciaBiotech). A fin de eliminar una posible contaminación con ADN genómico, 8 µl de cada ARN (entre 88 ng y 1,3 µg) fueron tratados a continuación, con 1 unidad de ADNasa I (Invitrogen) durante 15 min a temperatura ambiente en un volumen final de 10 µL. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 µl de EDTA 25 mM y después se calentó durante 10 min a 65°C. La transcripción inversa de los ARNs tratados con ADNasa I (10 µl) se realizó utilizando 15 unidades de transcriptasa inversa ThermoScript (ThermoScript RT-PCR System, Invitrogen) y cebadores oligo(dT) con una concentración final de 0,25 µM.

Una primera reacción de PCR (volumen final de 25 µl) que daba como resultado un fragmento de 250 pb, se llevó a cabo después en 1 µl de los productos de la transcripción inversa con 0,2 unidades de polimerasa de ADN Platinum Taq (ThermoScript RT-PCR System, Invitrogen) y los cebadores específicos (cebador directo: 5'-TGTCCTAGCCATTGCTGATATGC-3' (SEQ ID No. 35) y cebador inverso: 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3' (SEQ ID No. 36); concentración final de cada uno 0,2 µM) situados en el exón IV y el exón V del ADNc humano de 5-HT2cR, respectivamente. Después de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 3 min, la PCR llegó a su punto final después de 35 ciclos (15 s a 95°C; 30 s a 60°C; 20 s a 72°C), y una etapa de elongación final de 2 min a 72°C. Las partes alícuotas de los productos de la amplificación se utilizaron para comprobar el producto sobre un gel analítico de agarosa al 2%.

Segunda PCR y separación de fragmentos de ADNc monocatenario mediante Electroforesis Capilar (CE)

Se empleó 1 µl de una dilución 1/50 de los primeros productos de la RT-PCR, o el ADNc de 250 pb amplificado procedente de plásmidos que albergaban treinta y dos estándares de isoformas de 5-HT2cR humano (o 5HT2CR), como moldes para una PCR anidada aditiva. Estos 32 estándares, eran correspondientes a las isoformas no editadas (NE) y editadas de 5-HT2cR humano. Las amplificaciones se realizaron en un volumen final de 20 µl con cebadores fluorescentes purificados mediante HPLC (cebador directo: FAM-ATGTGCTATTTTCAACAGCGTCCATC-3' (SEQ ID No. 37); cebador inverso: VIC-GCAATCTTCATGATGGCCTTA-3' (SEQ ID No. 38); concentración final de cada uno 0,2 µM), y 0,2 unidades de polimerasa de ADN Platinum Pfx (Invitrogen).

El cebador inverso marcado con VIC se hibrida con una secuencia complementaria del receptor 5-HT2C, idéntica en seres humanos, ratón y rata. Por otro lado, aunque se utilizaba con muestras humanas, la secuencia del cebador directo marcado con FAM se había diseñado para ser lo más parecida posible a la del ratón. Más precisamente, los residuos de T en las posiciones 5 y 6 de la secuencia de oligonucleótidos humana (posiciones 1133 y 1134 de la referencia humana U49516), se cambiaron a G y C, respectivamente.

Las simulaciones de vías de plegado estocástico de ambas cadenas del producto de la PCR obtenido con los dos cebadores descritos anteriormente, se llevaron a cabo con el servidor Kinefold (kinfold.curie.fr). Mostraban que las estructuras de energía libre más baja, obtenidas para las cadenas directas e inversas - la región editada incluida en el bucle de una estructura de tallo-bucle, y capaces de hibridarse con una secuencia complementaria localizada en otra parte en la estructura completa después del plegado del tallo - eran muy parecidas a la calculada para un producto de PCR anidada de ratón utilizado con éxito en las muestras de ratón. Este conjunto de cebadores mostraba que era óptimo para un análisis conformacional de la edición del ARNm de 5HTR2C humano mediante electroforesis capilar no desnaturalizante con polimorfismo conformacional de cadena sencilla (CE-SSCP).

El fragmento amplificado tiene una longitud de 127 pb. En cuanto a la RT-PCR, después de una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, la reacción de amplificación finalizó con 35 ciclos (15 s a 94°C; 30 s a 55°C; 20 s a 68°C) y una etapa de elongación final de 2 min a 68°C. Una vez más, la calidad de los fragmentos amplificados con una longitud de 127 pb, se evaluó en un gel de agarosa al 2% antes del análisis posterior en un analizador genético 3100 Avant (Applied Biosystem).

Los productos fluorescentes de la PCR correspondientes a las isoformas estándar (1 µl de una dilución 1/100 en agua tratada con DEPC) y las muestras (1 µl de una dilución 1/30) diluidas en 11 µl de formamida desionizada, se añadieron a una mezcla de patrones de migración marcados con ROX (MWG-BIOTECH, AG) (0,5 µl cada uno) que cubrían todo el intervalo de los tiempos de retención del electroforegrama. Estos patrones de ROX se utilizaron para la calibración de CE y, posteriormente, para obtener la superposición correcta de patrones y picos de las muestras. Después de una desnaturalización durante 2 min a 95°C, las muestras se enfriaron inmediatamente sobre hielo. Se realizó una CE no desnaturalizante en un analizador genético ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems) a través de capilares de 80 cm de longitud, cargados con 7% de "POP Conformational Analysis Polymer" (Applied Biosystems), 1X TBE y sin glicerol. Después de una migración previa realizada a 15 kV durante 3 min, las muestras se inyectaron durante 15 s a 2 kV, y la electroforesis se ejecutó durante 105 minutos a 15 kV a una temperatura controlada de 20°C. Con estas condiciones de síntesis, cada una de las treinta y dos isoformas posibles se determinaron claramente como consecuencia de la conformación de ADNss sencillo, obtenida ya sea con la cadena

marcada con FAM o marcada con VIC. Los diferentes tiempos de retención fueron utilizados para la identificación inequívoca de las isoformas.

Identificación y cuantificación relativa de cada isoforma en cada muestra de cerebro

5 La señal electroforética se procesó entonces usando un programa informático del propio laboratorio. En primer lugar, la base temporal de los perfiles electroforéticos de cada muestra se ajustó usando las cadenas marcadas con ROX de los patrones de migración. Esto permitió que las cadenas marcadas con FAM y con VIC desconvolucionaran con precisión las señales de los patrones y de las muestras en una base temporal única. El ruido de fondo se ajustó después y se restó y el área total bajo cada señal se normalizó, a continuación.

10 Se procesó la proporción relativa de cada isoforma mediante un ajuste óptimo de cada señal analítica desconvolucionada y normalizada de las muestras de cerebro. Se llevó a cabo mediante el ajuste iterativo de la señal integrada representada por las 32 señales analíticas estándares desconvolucionadas y normalizadas de manera similar. El cálculo se basó en la hipótesis de que la señal de SSCP

$S(t) = \sum_{i=1}^N g_i R_i(t)$ en la que $R_i(t)$, con $i \in \{1, \dots, N\}$ son las señales estándares y g_i es el % de cada una de ellas en la señal. El ajuste óptimo minimizó la suma de los cuadrados de error (SSE)

$$SSE = \int \left[S(t) - \sum_{i=1}^N g_i R_i(t) \right]^2 dt$$

y se controló mediante el análisis estadístico de los mínimos cuadrados.

El resultado de este ajuste óptimo se evaluó estadísticamente tras el cálculo del valor de r^2 , tal como

$$r^2 = 1 - \frac{SSE}{SSM}$$

20 en donde SSM es la suma de cuadrados de las desviaciones de la media, tal como

$$SSM = \sum_{i=1}^l (S(t) - \bar{S})^2$$

El ajuste óptimo teórico máximo proporcionará una $r^2=1$.

25 Todos los experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones de ciego y todas las muestras se sometieron a ensayo en el mismo lote para las reacciones de RT-PCR y de segunda PCR. Los resultados de ajuste óptimo produjeron un perfil de edición específico para cada muestra individual, que se determinó a partir del porcentaje de cada forma editada y no editada de la señal analítica total. Estos valores iniciales se utilizaron para los análisis estadísticos.

Este método proporciona la proporción de cada isoforma de ARNm expresada como el porcentaje del total de receptor de 5-HT2c presente en el extracto.

30 A modo de ejemplo se proporciona en este documento la tabla de identificación de las 32 isoformas humanas, en donde cada cadena marcada con FAM y VIC proporciona un conjunto de tiempo de retención (véase la figura 1). Es fácil observar que el uso de las dos cadenas puede determinar la identificación total de las 32 isoformas estándares.

35 La principal ventaja de este tratamiento es ofrecer una estimación cuantitativa completa de la distribución de las isoformas de 5HT2cR expresadas (perfil de edición) a una concentración dada de ARNm de 5HT2cR. Esto se obtiene a partir de un único ensayo y permite determinar de forma sencilla las características de este perfil en una situación dada. Con esta técnica se ha podido demostrar en un grupo de 6 pacientes deprimidos que se habían suicidado, una firma específica que caracteriza el grupo de pacientes deprimidos. Esta firma proporciona una información interesante acerca de la desregulación del proceso de edición que tiene lugar en las regiones prefrontal dorsal del cerebro y dar un fuerte apoyo al interés de explorar el estado estacionario de las enzimas de edición en

40 muestras de piel y sangre de pacientes deprimidos.

Ejemplo 3: Expresión de 5HT2CR en piel humana y de ratón

La piel, debido a la presencia dérmica de receptores de 5-HT2c y enzimas de edición, podría ser una fuente interesante para la medición en la periferia tanto de la edición de 5-HT2cR como del nivel de expresión de las enzimas de edición.

45 La Figura 2 representa un control típico de las RT-PCRs realizadas después de la extracción de ARNs poliA+ a partir de muestras de piel humana (A) o de ratón (B).

La aplicación de la separación por electroforesis capilar de los productos SSCP de los productos de la segunda PCR anidada, consigue llegar a la demostración de que, en la piel humana y de ratón, las enzimas de edición ADAR1 y ADAR2 estaban activas y que estados patológicos o fisiopatológicos podrían modificar en este tejido periférico la

regulación de la edición del 5-HT2cR.

Ejemplo 4: Localización y naturaleza de la expresión de las isoformas ADAR1 y ADAR2

Como se ha previsto en los experimentos de validación precedentes, se ha encontrado que la expresión de las isoformas ADAR1 y ADAR2 se realizaba en las muestras de piel de ratón y de piel humana.

- 5 La figura 3 muestra un ejemplo de control de la identificación con RT/PCR de ADAR1 150, ADAR1 110 y ADAR2 en experimentos llevados a cabo después de la extracción de ARNs de sangre total o de piel de ratón.

En el hombre también era posible identificar y cuantificar fácilmente el nivel de expresión de las enzimas de edición después de la recogida de un pequeño volumen de sangre.

- 10 Con un rendimiento típico de $1-2 \times 10^6$ leucocitos por ml de sangre recién recogida, un volumen de 5 ml permite aislar suficiente ARN total para reacciones de transcripción inversa. Las muestras de sangre (5 ml) se recogen en tubos heparinizados. Las siguientes etapas del protocolo deben llevarse a cabo inmediatamente en condiciones estériles. Diluir el material de la muestra anticoagulada con un volumen igual de solución estéril de NaCl al 0,9%, o una solución estéril de 1X PBS, o medio de cultivo RPMI 1640 estéril. El medio de separación (por ejemplo, Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, ref.: 17-1440-02 o 17-1440-03) se debe calentar hasta la temperatura ambiente justo antes del uso y proteger de la luz. Llenar un tubo LeucoSep de 15 ml (Greiner Bio-One, ref.: 163 289 o 163 290) con 3 ml de medio de separación. Centrifugar durante 30 s a 1000 g y temperatura ambiente (el medio de separación después está por debajo de la barrera porosa del tubo). Cuando se utilizan tubos LeucoSep que están llenados previamente con medio de separación, las etapas mencionadas anteriormente se pueden cancelar (ref.: 163 288 o 227 288). Simplemente calentar los tubos a temperatura ambiente. Verter cuidadosamente la muestra de material diluido no coagulado (1:2 en solución salina equilibrada o RPMI 1640, véase más arriba) en el tubo LeucoSep de 15 ml. Centrifugar 10 minutos a 1000 g y temperatura ambiente, o 15 minutos a 800 g y temperatura ambiente en un rotor de cubeta oscilante.

Frenos de desconexión de la centrifuga

- 25 Después de la centrifugación, se recoge la fracción celular enriquecida (linfocitos/PBMCs = anillo blanco) por medio de una pipeta Pasteur. Se lava la fracción celular enriquecida con 10 ml de solución estéril de 1X PBS, posteriormente se centrifuga 10 minutos a 250 g. Repetir la etapa de lavado dos veces. Para la última centrifugación, los sedimentos se deben recoger en tubos de microcentrifuga (tubos Eppendorf de 1,5 ml) a través de una resuspensión en 1 ml de solución estéril de 1X PBS. Después de la última centrifugación (10 minutos a 250 g y temperatura ambiente) retirar el material sobrenadante y cubrir rápidamente el sedimento "seco" de fracciones celulares enriquecidas con reactivo de estabilización de ARN RNAlater (Qiagen, ref.: 76104 o 76106). Si los sedimentos sumergidos se almacenan a 2-8°C, el perfil de expresión génica de los linfocitos/PBMCs se puede estabilizar hasta 4 semanas a esa temperatura. Si las muestras se transportan en reactivo RNAlater, asegurar que los sedimentos siempre están sumergidos en el reactivo. O bien mantener los tubos en posición vertical durante el transporte o llenar los tubos completamente con la solución de estabilización. Durante el transporte los tubos se pueden tener en una caja de poliestireno llena de bolsas de hielo azules. Una solución mejor podría ser lisar directamente los sedimentos de la fracción celular enriquecida en 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen, ref.: 15596-026), conservar y enviar a temperatura ambiente. Como este reactivo de lisis contiene fenol, los tubos de las muestras deben estar herméticamente cerrados. En realidad, como describe la entidad suministradora (Invitrogen), el lisado de leucocitos en reactivo TRIzol (véase más arriba) permite extracciones posteriores del ARN total (fase acuosa) y las proteínas (fase orgánica). Los tubos se podrían enviar a temperatura ambiente o en hielo seco.

Un ejemplo de validación se proporciona en la figura 4 en la que se presenta el control de los productos de la RT-PCR de enzimas de edición en muestras de cerebro humano, piel y células sanguíneas CD4 y CD8.

- 45 De este modo es posible, en los seres humanos, analizar correctamente la expresión de las enzimas de edición en muestras de cerebro (estudios post mortem), piel y sangre (estudios de diagnóstico) como se ilustra en el experimento de control presentado en la figura. 5

Quando se verifican todos los elementos de la tabla 2, es posible dilucidar las condiciones precisas y los límites del análisis de la expresión de las enzimas de edición de la sangre y la piel, y el perfil de edición de 5-HT2/C en la piel como biomarcadores en el diagnóstico y el tratamiento de diversos estados patológicos en seres humanos, con una validación profunda que proviene de modelos fisiopatológicos o fármacopatológicos adecuados.

- 50 Ejemplo 5: Análisis de las isoformas del receptor de 5-HT2C en muestras de cerebro de pacientes con suicidio depresivo post mortem, en comparación con muestras de pacientes de control.

- 55 El proceso analítico ilustrado en la figura 1 permite el análisis de todas las isoformas del receptor de 5-HT2c en muestras de cerebro post mortem. Un estudio de 6 pacientes de control y pacientes suicidas depresivos cuidadosamente seleccionados, mostraba que: (1) regiones específicas del cerebro muestran un patrón específico de distribución de las isoformas de 5-HT2CR editadas y no editadas, y (2) este patrón de distribución está significativamente alterado en la corteza cingulada anterior humana y la corteza prefrontal dorsal, las cuales están

5 implicadas en la fisiopatología de la depresión mayor. Estos cambios en la firma de las isoformas se ilustran en la tabla 3, que muestra los efectos observados en la corteza cingulada anterior. Es importante destacar que esta técnica puede medir cambios dinámicos en la prevalencia de isoformas en ambas direcciones, incrementos o disminuciones, en comparación con los controles, proporcionando una información sobre la disfunción enzimática potencial subyacente a los cambios. En este caso, por ejemplo, la actividad de ADAR I (que edita específicamente los sitios A y B, y, con menos especificidad, el sitio C) está regulada al alza.

10 Tabla 3: Perfiles de edición obtenidos en los controles y pacientes suicidas depresivos. El perfil de edición total se midió en pacientes de ambos grupos (n = 6 en cada uno). Los resultados representan la prevalencia de una isoforma como un porcentaje de todas las isoformas y proporcionada como la media \pm SEM. Los dos aspectos de la firma - la distribución de todas las isoformas y la distribución de acuerdo con sitios de edición individuales - se analizaron mediante ANOVA II.

Tabla 3

Corteza cingulada anterior																												
Distribución de las isoformas de ARNm																												
Isoformas de ARNm	AE	ABDE	BCE	CE	D	ABE	AC	AD	ACD	BCD	ACDE	ADE	ABCD	BDE	B	C	NE	DE	BD	CD	A	AB	ACE	ABD	BC	ABC	ABCDE	
Proteínas correspondientes	VDI	VDV	MGI	IGI	INV	VDI	VSI	VNV	VSV	MSV	VG	VDV	VSV	MDV	MNI	ISI	INI	IGV	MNV	ISV	VNI	VNI	VGI	VNV	MSI	VSI	VGI	
Media (Controles)	1.0	2.2	0.1	1.5	3.7	1.4	4.0	6.8	5.2	0.4	2.5	0.6	16.3	0.3	0.7	3.9	8.1	0.9	1.1	1.4	6.5	5.0	4.1	10.6	0.8	5.9	0.7	1.8
SEM	0.5	0.4	0.1	0.5	0.4	0.4	0.5	1.3	1.1	0.1	0.5	0.1	2.2	0.3	0.3	0.4	1.6	0.1	0.3	0.3	0.8	1.0	0.8	1.0	0.2	0.9	0.2	0.7
Media (depresivos)	0.3	0.9	0.1	0.7	1.7	0.6	3.2	5.5	4.3	0.3	2.3	0.5	15.1	0.3	0.7	4.1	8.9	1.0	1.2	1.6	7.5	6.6	5.5	14.9	1.2	10.1	1.3	4.0
sem	0.1	0.2	0.0	0.2	0.5	0.1	1.0	0.7	1.0	0.2	0.6	0.1	3.4	0.1	0.3	0.7	1.4	0.0	0.6	0.4	0.7	0.1	1.7	2.1	0.3	1.6	0.4	0.7
% de variación frente a control	-75.9	-82.0	-99.0	-56.2	-55.0	-54.3	-19.8	-19.2	-17.7	-17.6	-9.8	-9.7	-7.1	0.0	1.9	4.6	10.8	11.3	12.9	13.1	15.1	30.4	35.4	40.1	47.1	70.7	75.9	121.8
valores de p (prueba t)	0.091	0.0008	0.155	0.062	0.0004	0.0004	0.256	0.195	0.279	0.398	0.373	0.371	0.391	0.600	0.488	0.412	0.345	0.186	0.418	0.353	0.187	0.071	0.228	0.009	0.157	0.001	0.106	0.003
p ANOVA	p=0.03																											
factor: grupo depresivo	p=0.0003																											
Distribución de sitios editados en la estructura																												
	A	B	C	D	E																							
Media de controles	74.9	47.2	47.3	49.9	15.4																							
SEM	1.8	2.9	3.2	1.7	1.9																							
Media de depresivos	82.6	57.0	53.1	51.6	16.4																							
SEM	0.8	0.4	0.5	0.4	0.3																							
% de variación frente a control	10.3	20.8	12.4	3.4	6.1																							
valores de p (prueba t)	0.004	0.001	0.09	0.24	0.35																							
valores de p ANOVA	0.0003																											
Factor: grupo depresivo	0.600																											

Ejemplo 6: El tratamiento con interferón alfa2 en ratones induce un aumento significativo de la expresión de ADAR1 en sangre. Este efecto periférico también se identifica en la piel y en el cerebro.

5 Este experimento se realizó en ratones Balb/cJ ratón. Una dosis de 20.000 UI de interferón alfa de ratón se inyectó por vía IP y grupos de ratones (n = 8) fueron sacrificados 3, 6 y 8 horas después de la inyección. Un grupo de control (n = 8) fue sacrificado en el tiempo cero. La sangre, la piel y el cerebro fueron procesados rápidamente para evitar una degradación del ARN. El ARN total se extrajo a partir de cada muestra de tejido y el ARNm específico que codificaba ADAR1 inducible se cuantificó por QPCR usando un gen endógeno GAPDH como referencia. Los resultados se resumen en la figura 6. Se muestra claramente que cuando se observa un aumento significativo en la expresión de ADAR 1 en las muestras de sangre de ratones tratados con interferón, se observa también una respuesta amplificada en las muestras de piel y en la corteza prefrontal.

Además, se determinó el perfil de edición de 5-HT2cR de acuerdo con los métodos descritos previamente (véase el ejemplo 2) en el área prefrontal de ratones de control y tratados con interferón, sacrificados a las 8 horas. En la tabla 4, es fácil de observar que:

15 1) Después de la inducción de ADAR 1, la expresión tiene lugar rápidamente en el cerebro, en estas condiciones experimentales, una alteración temprana significativa del proceso de edición de 5-HT2cR se observa a las 8 horas. Se encontró un aumento significativo en un grupo de 12 isoformas editadas que incluían las isoformas ABCD y ACD. Representan más del 30% del ARNm total de 5-HT2cR.

20 2) El análisis de las proporciones de sitios editados en este grupo muestra claramente un aumento significativo en las proporciones de los sitios A, B y C que estaban editados. Se pueden interpretar como que principalmente son el resultado de una mayor actividad de ADAR1. Esto se confirma cuando el análisis se restringe a las isoformas de este grupo que son exclusivamente debidas a la actividad de ADAR 1.

25 Tabla 4: Análisis de la alteración del perfil de edición del ARNm de 5-HT2cR después del tratamiento con interferón. En cada individuo, el perfil o la edición total se midió como la proporción de cada isoforma editada en el ARNm específico total del receptor. Los resultados presentados son la media \pm SEM de ratones controles y ratones tratados con interferón, sacrificados 8 horas después de la inyección. Los valores de p se calcularon a partir de la prueba de Student. Se presentan de este modo: la suma de las isoformas editadas que habían aumentado en el grupo tratado con interferón, la proporción de los sitios A, B, C, D y E que se habían editado en este grupo de isoformas y la proporción relativa de ARNm, representada por las isoformas de este grupo que es exclusivamente el resultado de una acción específica de ADAR1.

30 Por último es razonable proponer que la medida de los cambios en la expresión de las ADARs en la periferia (sangre) podría predecir una alteración importante de la edición en el cerebro, lo que podría explicar los efectos secundarios sobre el estado de ánimo de varios tratamientos que ya se utilizan en distintos campos terapéuticos.

Isoformas incrementadas de ARNm de 5-HT2c R editado			
ABCDE (VG) ABC (VSI) CDE (IGV) AVBCD (VSV) ABCE (VGI) D (INV) ACD (VSV) ABE (VDI) BD (MNV) AC (VSI) BCDE (MGV) B (MNI) E (IDI)			
representa (% del total)			
controles	tratados con INF	% de variación	p
29,6 ± 0,6	32,1 ± 0,4	10,1	0,005
Proporción correspondiente de sitios editados encontrados			
A	23,8 ± 0,6	6,1	0,03
B	22,6 ± 0,6	6,9	0,02
C	23,8 ± 0,6	6,4	0,03
E	3,2 ± 0,2	13,7	0,06
D	22,4 ± 0,8	6,7	0,09
ADAR1			
ADAR2			
Isoformas incrementadas exclusivamente debido a la acción de ADAR1			
ABC (VSI) ABCE (VGI) ABE (VDI) AC (VSI) B (MNI)			
representa (% del total)			
controles	tratados con INF	% de variación	p
7 ± 0,3	7,7 ± 0,2	10,1	0,03
ADAR1			

Listado de secuencias

- 5 <110> BIOCORTECH
WEISSMANN, Dinah
PUJOL, Jean-François
VINCENT, Laurent
CAVAREC, Laurent
MANN, John
- 10 <120> Muestra de tejido periférico que contiene células que expresan 5HTR2C y/o ADARs, como marcadores de la alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C y sus aplicaciones
- <130> D25626
- 15 <150> 60/943685
<151> 13-06-2007
- <150> 61/023239
<151> 31-01-2008
- 20 <160> 51
- <170> PatentIn versión 3.3
- 25 <210> 1
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
- <400> 1
- 35 atacgtaatc ctatt 15
- <210> 2
<211> 15
<212> ADN
- 40 <213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
- 45 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(1)
<223> n=i
- 50 <400> 2
- ntacgtaatc ctatt 15
- <210> 3
- 55 <211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
- 60 <220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> n=i
- 65 <400> 3

ES 2 646 592 T3

atn^{cg}taatc ctatt 15

5 <210> 4
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
<222> (8)..(8)
15 <223> n=i

<400> 4

atacgtantc ctatt 15

20 <210> 5
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
30 <221> base_modificada
<222> (13)..(13)
<223> n=i

<400> 5

35 atacgtaatc ctntt 15

40 <210> 6
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
45 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
50 <223> n=i

<400> 6

atacgnatc ctatt 15

55 <210> 7
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
65 <221> base_modificada
<222> (1)..(1)
<223> n=i

ES 2 646 592 T3

<220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
5 <223> n=i

<400> 7

ntncgtaatc ctatt 15
10
<210> 8
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
15
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
20 <221> base_modificada
<222> (1)..(1)
<223> n=i

<220>
25 <221> base_modificada
<222> (8)..(8)
<223> n=i

<400> 8
30
ntacgtantc ctatt 15

<210> 9
<211> 15
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
40 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(1)
<223> n=i
45
<220>
<221> base_modificada
<222> (13)..(13)
<223> n=i
50
<400> 9

ntacgtaatc ctntt 15
55
<210> 10
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
60
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
65 <222> (1)..(1)
<223> n=i

ES 2 646 592 T3

<220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
5 <223> n=i

<400> 10

ntacgtnatc ctatt 15
10
<210> 11
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
15
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
20 <221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> n=i

<220>
25 <221> base_modificada
<222> (8)..(8)
<223> n=i

<400> 11
30
atnctgtantc ctatt 15

<210> 12
<211> 15
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
40 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> n=i
45
<220>
<221> base_modificada
<222> (13)..(13)
<223> n=i
50
<400> 12

atnctgtaatc ctntt 15
55
<210> 13
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
60
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
65 <222> (3)..(3)
<223> n=i

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 5 <223> n=i

 <400> 13

 10 atncgtnatc ctatt 15
 <210> 14
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> n=i

 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> n=i

 30 <400> 14
 atacgtantc ctntt 15

 <210> 15
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> n=i
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> n=i
 50
 <400> 15

 atacgtnntc ctatt 15

 55 <210> 16
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

 <220>
 <221> base_modificada
 65 <222> (7)..(7)
 <223> n=i

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 5 <223> n=i

 <400> 16

 atacgtnatc ctntt 15
 10
 <210> 17
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> n=i

 <220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> n=i

 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> n=i

 <400> 17
 35
 ntncgtantc ctatt 15

 <210> 18
 <211> 15
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> n=i
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> n=i
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> n=i
 60
 <400> 18

 ntncgtaatc ctntt 15

 <210> 19
 65 <211> 15

ES 2 646 592 T3

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(1)
10 <223> n=i

<220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
15 <223> n=i

<220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
20 <223> n=i

<400> 19

ntnctgntatc ctatt 15
25

<210> 20
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
30

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
35 <221> base_modificada
<222> (1)..(1)
<223> n=i

<220>
40 <221> base_modificada
<222> (8)..(8)
<223> n=i

<220>
45 <221> base_modificada
<222> (13)..(13)
<223> n=i

<400> 20
50

ntacgtantc ctntt 15

<210> 21
<211> 15
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
60 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(1)
65 <223> n=i

<220>

<221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> n=i

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> n=i

10 <400> 21
 ntacgtnttc ctatt 15

15 <210> 22
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> n=i

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> n=i

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> n=i

40 <400> 22
 ntacgtnatc ctntt 15

45 <210> 23
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> n=i

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> n=i

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> n=i

<400> 23
 atncgtantc ctntt 15

ES 2 646 592 T3

<210> 24
<211> 15
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

10 <220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> n=i

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
<223> n=i

20 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)..(8)
<223> n=i

25 <400> 24

atnctgtnttc ctatt 15

30 <210> 25
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(3)
40 <223> n=i

<220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
45 <223> n=i

<220>
<221> base_modificada
<222> (13)..(13)
50 <223> n=i

<400> 25

atnctgtnttc ctntt 15

55 <210> 26
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
65 <221> base_modificada
<222> (7)..(7)

<223> n=i
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (8)..(8)
 <223> n=i
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (13)..(13)
 <223> n=i
 <400> 26
 15 atacgtnntc ctntt 15
 <210> 27
 <211> 15
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> n=i
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> n=i
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> n=i
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> n=i
 45 <400> 27
 ntncgtantc ctntt 15
 <210> 28
 50 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 60 <223> n=i
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 65 <223> n=i

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> n=i
 5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> n=i
 10
 <400> 28
 ntncgtnntc ctatt 15
 15 <210> 29
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (1)..(1)
 <223> n=i
 <220>
 <221> base_modificada
 30 <222> (3)..(3)
 <223> n=i
 <220>
 <221> base_modificada
 35 <222> (7)..(7)
 <223> n=i
 <220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (13)..(13)
 <223> n=i
 <400> 29
 45 ntncgtnatc ctntt 15
 <210> 30
 <211> 15
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> n=i
 60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> n=i
 65 <220>
 <221> base_modificada

<222> (8)..(8)
 <223> n=i

<220>
 5 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> n=i

<400> 30
 10 ntacgtnttc ctntt 15

<210> 31
 <211> 15
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> n=i
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> n=i
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 <223> n=i
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> n=i
 40

<400> 31
 atncgtnttc ctntt 15

<210> 32
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial
 45

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN derivado del mRNA que codifica el receptor 5-HT2C
 50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> n=i
 <220>
 55

<221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> n=i
 60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> n=i
 65

ES 2 646 592 T3

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)
 5 <223> n=i

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 10 <223> n=i

 <400> 32

 ntncgtnntc ctntt 15
 15
 <210> 33
 <211> 15
 <212> RNA
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for 5-HT2C receptor

 <400> 33
 25
 auacguaauc cuauu 15

 <210> 34
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for 5-HT2C receptor
 35
 <400> 34

 ttctgcctc agtccaatca c 21
 40
 <210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for 5-HT2C receptor

 <400> 35
 50 tgtccctagc cattgctgat atgc 24

 <210> 36
 <211> 24
 <212> ADN
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for 5-HT2C receptor
 60 <400> 36

 gcaatctca tgatggcctt agtc 24

 <210> 37
 65 <211> 26
 <212> ADN

ES 2 646 592 T3

<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for 5-HT2C receptor

5 <400> 37

atgtgctatt tcaacagcg tccatc 26

10 <210> 38
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for 5-HT2C receptor

<400> 38

20 gcaatcttca tgatggcctt a 21

<210> 39
<211> 18
<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for 5-HT2C receptor

30 <400> 39

tttggcccc gtctggat 18

<210> 40
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for 5-HT2C receptor

<400> 40

40 gccttagtcc gcgaattg 18

45 <210> 41
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for human ADAR1 150 isoform

<400> 41

55 gcctcgggg cgcaatgaat cc 22

<210> 42
<211> 22
<212> ADN

60 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for human ADAR1 150 isoform

65 <400> 42

ES 2 646 592 T3

ctgccccttc tttgccaggg ag 22

5 <210> 43
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for human ADAR1 110 isoform

<400> 43

cgagccatca tggagatgcc ctcc 24

15 <210> 44
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for human ADAR1 110 isoform

<400> 44

25 catagctgca tcctgcttgg ccac 24

30 <210> 45
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for human ADAR2

<400> 45

gctgcgcagt ctgccctggc cgc 23

40 <210> 46
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for human ADAR2

<400> 46

50 gtcatgacga ctccagccag cac 23

55 <210> 47
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for murine ADAR1 150 isoform

60 <400> 47

gtctcaaggg ttcaggggac cc 22

65 <210> 48
<211> 24
<212> ADN

ES 2 646 592 T3

<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for murine ADAR1 150 isoform

5 <400> 48

ctcctctagg gaattcctgg atac 24

10 <210> 49
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for murine ADAR1 110 isoform

<400> 49

20 tcacgagtg gcagcgtccg agg 23

<210> 50
<211> 23
<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for murine ADAR2

30 <400> 50

gctgcacagt ctgccttggc tac 23

<210> 51
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la secuencia artificial: sequence derived from the cADN coding for murine ADAR2

<400> 51

45 gcataaagaa acctgagcag ggac 24

REIVINDICACIONES

1. Un método para implementar una muestra biológica que consiste en un tejido periférico que contiene células para la evaluación de la alteración patológica de la edición de A a I del ARN dependiente de ADAR de 5HTR2C en el cerebro, en donde dicho tejido periférico que contiene células es una muestra de piel de mamífero seleccionada a partir del grupo consistente en una línea de células de la piel, células cultivadas obtenidas a partir de piel y una muestra de tejido de la piel, y en donde la alteración patológica de la edición de A a I del ARN dependiente de ADAR de 5HTR2C en el cerebro se detecta midiendo la edición de 5HTR2C en la muestra de piel.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicha patología se selecciona a partir del grupo que consiste en trastornos mentales, esquizofrenia, depresión, suicidio depresivo o conducta alimentaria anormal.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde este método comprende además la etapa de determinar los productos de expresión de ADARs contenidos en una segunda muestra de tejido periférico que es una muestra de sangre que contiene células de dicho paciente o mamífero.
4. El método según la reivindicación 3, en el que las células de la muestra de sangre que expresan ADARs son glóbulos blancos o leucocitos.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha tasa de edición o dicho perfil de las formas editadas se determina para todas las formas editadas y no editadas de dicho ARNm de 5HTR2C.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la tasa de edición para cada forma editada y sin editar o el perfil de las formas editadas de dicho ARNm de 5HTR2C se determina mediante un método que comprende las siguientes etapas:
- A) extracción de los ARNs totales de dicha línea de células de la piel, células cultivadas obtenidas a partir de la piel o tejido de la piel, seguida, en su caso, de una purificación de los ARNm;
- B) transcripción inversa de los ARNs extraídos en la etapa A); y
- C) amplificación con PCR de los ADNc obtenidos en la etapa B), usando al menos una pareja de cebadores específicos para el fragmento de ARNm de 5HTR2C que contiene los sitios de edición que se pueden editar, en donde esa pareja de cebadores se selecciona de forma que sea capaz de amplificar todas las formas editadas y la forma sin editar potencialmente presentes en el extracto de ARN,
- y
- en donde la etapa B) de transcripción inversa se lleva a cabo mediante el uso de un cebador oligonucleotídico específico del gen 5HTR2C que tiene la secuencia SEQ ID No. 34;
 - en donde en la etapa C), la etapa de amplificación con PCR es una PCR de tipo anidada que comprende dos ciclos de PCR, y en donde el primer ciclo de PCR se lleva a cabo mediante un conjunto de cebadores que da lugar a un producto de ácido nucleico de PCR que tiene una longitud comprendida entre 200 pb y 300 pb, y en donde el segundo ciclo de PCR se lleva a cabo mediante un conjunto de cebadores que da lugar a un producto final de ácido nucleico de PCR que tiene una longitud comprendida entre 90 pb y 160 pb.
7. El método según la reivindicación 6, en el que en la etapa C), la etapa de amplificación con PCR es una PCR de tipo anidada que comprende dos ciclos de PCR,
- en donde, para ratón, rata o ser humano, el primer ciclo de PCR se lleva a cabo mediante el conjunto de cebadores:
 cebador directo 5'-TGTCCCTAGCCATTGCTGATATGC-3', y
 cebador inverso 5'-GCAATCTTCATGATGGCCTTAGTC-3'; y
 - en donde, para ser humano, el segundo ciclo de PCR se lleva a cabo mediante el siguiente conjunto de cebadores:
 cebador directo FAM-ATGTGCTATTTTCAACAGCGTCCATC-3', y
 cebador inverso VIC-GCAATCTTCATGATGGCCTTA-3'; y
 - en donde, para ratón y rata, el segundo ciclo de PCR se lleva a cabo mediante el siguiente conjunto de cebadores:
 cebador directo 5'-TTTGTGCCCGTCTGGAT-3', y
 cebador inverso 5'-GCCTTAGTCCGCGAATTG-3'.
8. El método según la reivindicación 7, en el que la tasa de edición para cada forma editada y sin editar o el perfil de

las formas editadas de dicho ARNm de 5HTR2C se determina mediante un método SSCP capaz de proporcionar el perfil de edición para cada una de las formas distintas editadas y sin editar de dicho ARNm, en donde dicho método SSCP está caracterizado porque comprende después de las etapas A), B) y C) las siguientes etapas:

- D) en su caso, una purificación de los productos de la PCR obtenidos en la etapa C);
- 5 E) en su caso, una cuantificación de los productos de la PCR obtenidos en la etapa D);
- F) una disociación de los ADNc de doble cadena en ADNc de cadena sencilla, en particular mediante calentamiento seguido de enfriamiento brusco;
- G) una separación de los ADNc de cadena sencilla mediante electroforesis capilar; y
- 10 H) una obtención del perfil de edición mediante una lectura de la fluorescencia y, en su caso, una adquisición de los datos del perfil por medio del sistema de explotación asociado con el lector de fluorescencia.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los productos de expresión de ADAR son los productos de expresión del gen ADAR1, isoformas 150 y/o 110, y del gen ADAR2, preferiblemente los productos de expresión del gen humano que codifica la proteína ADAR1, isoformas 150 kD y/o 110 kD, y la proteína ADAR2.

15 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los productos de expresión de las ADARs son los ARNm de las ADARs.

11. Un método según la reivindicación 10, en el que la determinación del ARNm de ADAR se lleva a cabo mediante un método que comprende las siguientes etapas:

- A) una extracción de los ARNs totales de dichas células de la muestra, seguida, en su caso, de una purificación de los ARNm;
- 20 B) una transcripción inversa de los ARNs extraídos en la etapa A); y
- C) una amplificación con PCR de los ADNc obtenidos en la etapa B), usando al menos una pareja de cebadores específicos para cada uno de los ARNm de ADAR que se van a cuantificar y/o analizar cualitativamente, y en donde en la etapa C), la pareja de cebadores específicos para la amplificación con PCR del ARNm de ADAR se selecciona a partir del grupo que consiste en:
 - 25 – para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-150 humana:
 - Directo: 5'-GCCTCGCGGGCGCAATGAATCC-3',
 - Inverso: 5'-CTTGCCCTTCTTTGCCAGGGAG-3';
 - para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-110 humana:
 - 30 Directo: 5'-CGAGCCATCATGGAGATGCCCTCC-3',
 - Inverso: 5'-CATAGCTGCATCCTGCTTGGCCAC-3';
 - para la amplificación del ARNm de ADAR2 humana:
 - Directo: 5'-GCTGCGCAGTCTGCCCTGGCCGC-3',
 - Inverso: 5'-GTCATGACGACTCCAGCCAGCAC-3';
 - para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-150 de ratón:
 - 35 Directo: 5'-GTCTCAAGGGTTCAGGGGACCC-3',
 - Inverso: 5'-CTCCTCTAGGGAATTCCTGGATAC-3';
 - para la amplificación del ARNm de la isoforma ADAR1-110 de ratón:
 - Directo: 5'-TCACGAGTGGCAGCGTCCGAGG-3',
 - Inverso: 5'-CTCCTCTAGGGAATTCCTGGATAC-3'; y
 - 40 – para la amplificación del ARNm de ADAR2 de ratón:
 - Directo: 5'-GCTGCACAGTCTGCCTTGGCTAC-3',

Inverso: 5'-GCATAAAGAAACCTGAGCAGGGAC-3'.

12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde los productos de expresión de las ADARs son las proteínas ADAR.

5 13. Uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para identificar *in vitro* si un paciente presenta una patología o tiene riesgo de desarrollar una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C en el cerebro, a partir de una muestra biológica del paciente que se va a someter a ensayo que contiene células de la piel, en donde ese método comprende las siguientes etapas:

a) determinar la tasa de edición o el perfil de las formas editadas de dicho ARNm de 5HTR2C expresado en dicha muestra de células de la piel; y, opcionalmente

10 b) determinar la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de células de la piel; e

c) identificar si dicho paciente presenta o tiene riesgo de desarrollar una patología de este tipo mediante una comparación de la tasa o el perfil de edición de dicho ARNm de 5HTR2C y la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra obtenida en la etapa a) y b) con la tasa o el perfil de edición de control característico del ARNm de 5HTR2C y el perfil de las ADARs expresadas obtenido para pacientes normales o para
15 pacientes que presentan patologías relacionadas con una alteración del mecanismo de edición de este ARNm en el cerebro.

14. Uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para determinar *in vitro* si una patología mostrada por un paciente está relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C en el cerebro, a partir de una muestra biológica del paciente que se va a someter a ensayo que contiene células de la
20 piel, en donde ese método comprende las etapas siguientes:

a) determinar la tasa de edición o el perfil de las formas editadas de dicho ARNm de 5HTR2C expresado en dicha muestra de células de la piel; y, opcionalmente

b) determinar la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de células de la piel; e

25 c) identificar si dicho paciente presenta o tiene riesgo de desarrollar una patología de este tipo mediante una comparación de la tasa o el perfil de edición de dicho ARNm de 5HTR2C y la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra obtenida en la etapa a) y b) con la tasa o el perfil de edición de control característico del ARNm de 5HTR2C y el perfil de las ADARs expresadas obtenido para pacientes normales o para pacientes que presentan patologías que se sabe que no están relacionadas con una alteración del mecanismo de edición de este ARNm.

30 15. Uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para identificar *in vitro* un agente que modula *in vivo* la edición del ARNm de 5HTR2C en el cerebro de un mamífero, a partir de una muestra biológica de dicho mamífero que contiene células de la piel, en donde dicho candidato modulador de la edición del ARNm de 5HTR2C se administra de antemano a dicho mamífero, en donde dicho método comprende las siguientes etapas:

a) determinar los efectos de dicho modulador

35 - sobre la tasa de edición o el perfil de las formas editadas de dicho ARNm de 5HTR2C expresado en dicha muestra de células de la piel; y, opcionalmente

40 - sobre la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de células de la piel, mediante una comparación de la tasa o el perfil de edición de dicho ARNm de 5HTR2C y la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra obtenida en la etapa a) con la tasa o el perfil de edición de dicho ARNm de 5HTR2C y la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas, obtenido a partir de la muestra de control de células de la piel.

16. Uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para determinar *in vitro* la eficacia de un fármaco utilizado para la prevención o para el tratamiento en un paciente de una patología relacionada con una alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C en el cerebro, a partir de una muestra biológica del
45 paciente que contiene células de la piel obtenida antes y durante y/o después del tratamiento, en donde este método comprende las siguientes etapas:

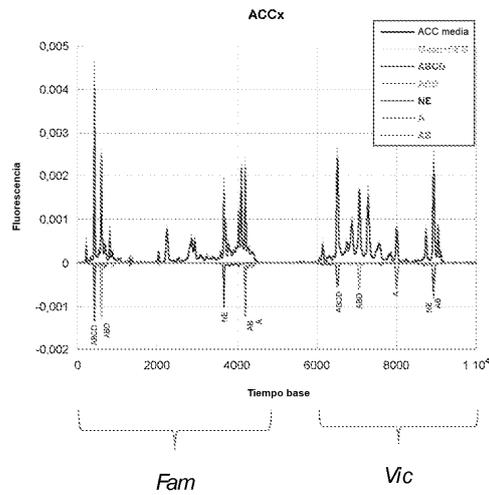
a) determinar en dichas muestras que contienen células de la piel obtenida antes y durante y/o después del tratamiento:

50 - la tasa o el perfil de edición de las formas editadas de dicho ARNm de 5HTR2C expresado en dichas muestras de células de la piel; y, opcionalmente

- la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dichas muestras de células de la piel; y

- 5 b) determinar la eficacia de dicho fármaco mediante la comparación de la tasa o el perfil de edición de dicho ARNm de 5HTR2C y la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dichas muestras obtenidas en la etapa a), la modulación de la tasa o el perfil de edición y la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas resultante en una tasa o perfil de edición y una naturaleza y/o una cantidad de las ADARs expresadas próxima o igual a la observada en pacientes normales siendo significativa de la eficacia del tratamiento.
17. Uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para determinar si un paciente responde o no responde a un tratamiento de una patología resultante o provocada por la alteración del mecanismo de edición del ARNm de 5HTR2C en el cerebro, que comprende además las etapas de:
- 10 c) determinar si el paciente responde o no responde al tratamiento mediante la observación de la modificación de la tasa o el perfil de edición y, opcionalmente, la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas después de un período de tratamiento (es decir, 15 días, 30 días, 2 meses, 6 meses, etc.) mediante una comparación con la tasa o el perfil de edición y, opcionalmente, la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas antes del comienzo del tratamiento.
- 15 18. Uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para identificar *in vitro* un agente que modula *in vitro* la edición del ARNm de 5HTR2C en un mamífero, en donde dicho método comprende las siguientes etapas:
- a) obtener una muestra biológica que contiene células a partir de una línea celular de piel de mamífero, opcionalmente, esas células pueden ser células recombinantes;
- 20 b) poner en contacto dicha muestra biológica en presencia de un candidato modulador de dicha edición del ARNm de 5HTR2C; y, opcionalmente
- c) determinar los efectos de dicho modulador
- sobre la tasa o el perfil de edición de las formas editadas de dicho ARNm de 5HTR2C expresado en dicha muestra de células de la piel; y
- 25 - sobre la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra de células de la piel, mediante una comparación de la tasa o el perfil de edición de dicho ARNm de 5HTR2C y la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas en dicha muestra obtenida en la etapa c) con la tasa o el perfil de edición de dicho ARNm de 5HTR2C y la naturaleza y/o la cantidad de las ADARs expresadas obtenidas a partir de una muestra de control de células de la piel.
- 30

Fam	Posición pico
ABCDE	428
BCDE	548
ABCD	630
ADE	757
BDE	799
ABD	804
CDE	830
ABDE	843
ACDE	1018
BCD	1247
ABCE	2244
AD	2455
BC	2622
BD	2993
CD	3022
ACD	3072
D	3159
BCD	3264
ADE	3814
NE	3885
C	3929
BE	3952
CE	3963
BC	4233
AC	4238
ACE	4302
ABC	4308
B	4318
AE	4393
AB	4411
E	4419



Vic	Posición pico
ABCDE	8149
BCE	8230
BCDE	8269
ABDE	8415
BDE	8469
ABDD	8513
BCD	8562
ABDE	8758
CD	8831
D	8896
ACCE	8896
BC	7021
ABCE	7065
ACE	7277
ACD	7298
ACD	7321
ABE	7505
BC	7522
DE	7810
AE	7886
BC	7988
AC	8244
E	8707
ABC	8921
BC	8933
BC	8975
BC	8988
E	8988

FIGURA 1

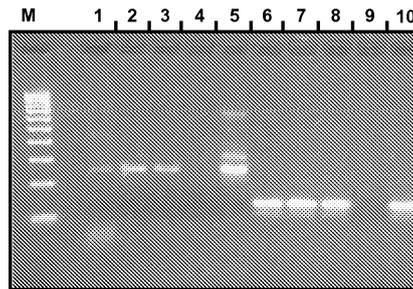


FIGURA 2A

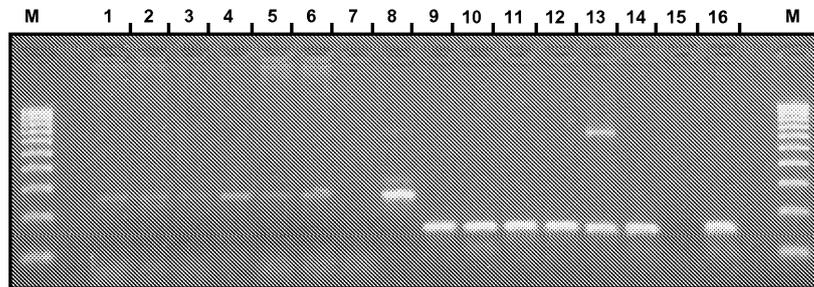


FIGURA 2B

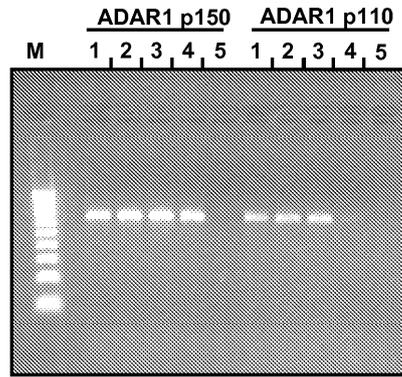


FIGURA 3A

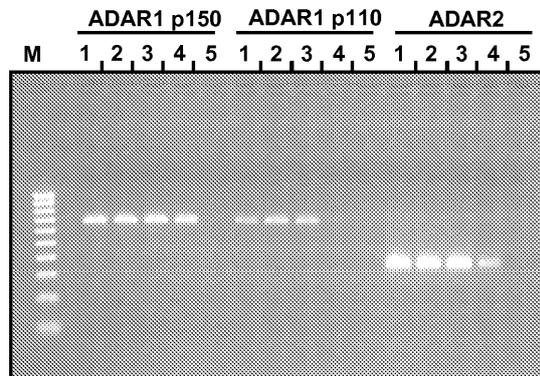


FIGURA 3B

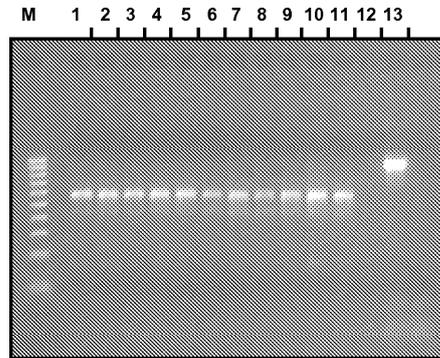


FIGURA 4A

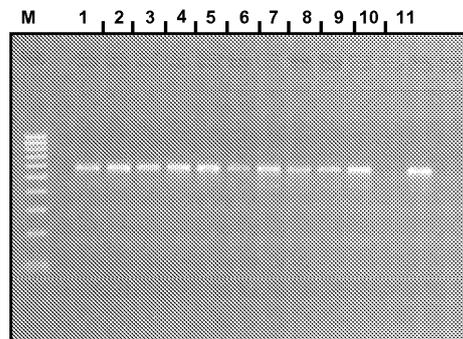


FIGURA 4B

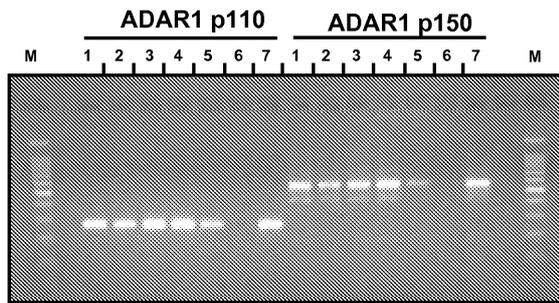


FIGURA 5A

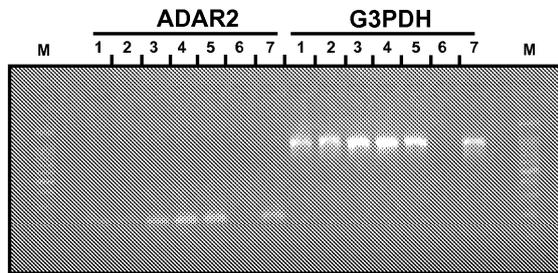


FIGURA 5B

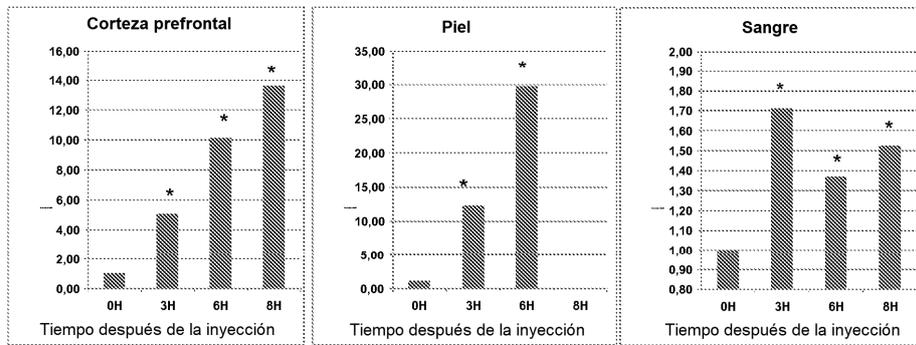


FIGURA 6A

FIGURA 6B

FIGURA 6C