

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 803**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6883 (2008.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2016 PCT/EP2016/063935**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2016 WO16202944**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2016 E 16729909 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3310926**

54 Título: **Método para el diagnóstico/pronóstico de la escoliosis idiopática del adolescente**

30 Prioridad:

16.06.2015 EP 15382319

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

12.12.2019

73 Titular/es:

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED (CIBER) (33.3%)
Monforte de Lemos, 5, Pabellón 11
28029 Madrid, ES;
HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA
FE (33.3%) y
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (33.3%)**

72 Inventor/es:

**GARCÍA GIMÉNEZ, JOSÉ LUIS;
BAS HERMIDA, TERESA;
PALLARDÓ CALATAYUD, FEDERICO VICENTE;
HERVÁS MARÍN, DAVID y
MENA MOLLÁ, SALVADOR**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 734 803 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

Método para el diagnóstico/pronóstico de la escoliosis idiopática del adolescente

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere de manera general al campo de la detección y el pronóstico de la escoliosis idiopática del adolescente (AIS), y más particularmente a microARN en circulación en plasma para la detección/pronóstico de AIS.

10

Antecedentes de la invención

Sin limitar el alcance de la invención, se describen sus antecedentes en relación con la escoliosis idiopática del adolescente (AIS).

15

Las deformidades de la columna vertebral, en particular la escoliosis, representan el tipo más frecuente de deformidades ortopédicas en niños y adolescentes. La escoliosis idiopática representa la forma más común de escoliosis (el 70-80% de las escoliosis diagnosticadas en adolescentes son idiopáticas). La escoliosis idiopática del adolescente (AIS; OMIM 181800) es una deformidad en 3D de la columna vertebral que provoca un desequilibrio coronal de hasta 10 grados. Afecta al 2-4% de la población de menores de 18 años en todo el mundo, lo que hace que sea la deformidad de la columna vertebral más común en esta etapa (Koniczny MR, Senyurt H, Krauspe R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J Child Orthop.* febrero de 2013; 7(1): 3-9). La AIS afecta principalmente a mujeres (aproximadamente el 85%) (Lonstein J.E. Adolescent idiopathic scoliosis. *The Lancet.* 1994; 344:1407-1412). Hay una predominancia de mujeres entre los casos graves, a pesar de que la razón entre hombres y mujeres es de 1:1 en curvas menores. Sin embargo, la razón de mujeres con respecto a hombres aumenta sustancialmente con la edad. En particular, la prevalencia de curvas con ángulos de Cobb más altos (> 40°) en mujeres aumenta hasta 7,2:1 (Koniczny MR, Senyurt H, Krauspe R. Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis. *J Child Orthop.* febrero de 2013; 7(1): 3-9). Clínicamente se caracteriza por dolor, deformidad estética y alteraciones en la función pulmonar. La genética y la epigenética (interacciones ambientales, estilo de vida, gravedad y nutrición) contribuyen a esta enfermedad, por lo que el diagnóstico y pronóstico de la AIS hacen que las decisiones clínicas supongan un desafío (Burwell R.G., Dangerfiel P.H., Moulton, A., Grivas T.B. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS), environment, exposome and epigenetics: a molecular perspective of postnatal normal spin growth and the etiopathogenesis of AIS with consideration of a network approach and possible implications for medical therapy. *Scoliosis.* 2011; 6: 26). Los pacientes son conscientes de que su vida se ve agravada por muchas incógnitas, y los tratamientos son a menudo ineficaces, invasivos y costosos. Los pacientes con escoliosis también han aumentado riesgos de salud (cáncer, cataratas, enrojecimiento de la piel, etc.) debido a la frecuente exposición a rayos X (The National Scoliosis Foundation; <http://www.scoliosis.org/info.php>) (Knott, P., *et al.* SOSORT2012 documento de consenso: reducing x-ray exposure in pediatric patients with scoliosis. *Scoliosis.* 2014; 9: 4).

En la actualidad, existe una prueba de pronóstico de AIS comercializada por Transgenomic Inc., EE.UU. (www.scoliscore.com). Esta prueba se basa en la identificación de mutaciones genéticas (53 loci genéticos) lo cual proporciona una propensión a largo plazo a desarrollar AIS grave. Sin embargo, desafortunadamente este producto no es útil para el análisis de la evolución de la AIS, ya que se basa en el análisis de 53 polimorfismos en genes y la genética de los pacientes no cambia a lo largo del tiempo. Además, el análisis ofrecido por ScoliScore no puede realizarse en unidades de análisis clínicos en hospitales, entre otras razones, porque las muestras deben enviarse a laboratorios de Transgenomic. Además, una prueba de este tipo no altera las opciones de tratamiento disponibles (Julien C., *et al.* Towards a comprehensive diagnostic assay for scoliosis. *Personalized Medicine* 2013; 10(1), 97-103).

Para superar los problemas mencionados anteriormente, los médicos requieren nuevas herramientas de diagnóstico y pronóstico para AIS para:

- detectar la escoliosis idiopática, en particular AIS, con los equipos ya existentes en los hospitales y con ninguna o poca formación específica para clientes/profesionales de la salud. Preferiblemente, también debe facilitar la detección temprana y tratamiento para proporcionar un efecto positivo sobre los resultados a largo plazo (según lo requiere Scoliosis Patients Europe, scolpat.eu/scoliosis/),

- predecir la evolución clínica de pacientes con AIS,

- planificar de forma coherente las visitas al hospital y minimizar exploraciones mediante rayos X,

- decidir el mejor momento para el tratamiento inicial con dispositivos ortopédicos y cirugía de columna vertebral,

- monitorizar los efectos positivos del ejercicio que algunas veces se recomienda para pacientes con AIS,

65

- comprender la infinidad de factores que influyen en la predisposición y la patogénesis de la AIS, y

- también debe identificar a pacientes con riesgo en casos familiares de AIS, preparando psicológicamente a los pacientes jóvenes que padecen no sólo limitaciones físicas y problemas fisiológicos, sino también deformidades estéticas del esqueleto.

5

Sumario de la invención

La presente invención resuelve el problema mencionado anteriormente proporcionando nuevos marcadores epigenéticos, en particular microARN que pueden contribuir a mejorar la caracterización de pacientes que padecen escoliosis idiopática, en particular AIS, y se basa en un estudio prospectivo basado en un análisis experimental del perfil epigenético de AIS.

10

En particular, la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar la escoliosis idiopática, en particular AIS, que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos uno o la combinación de microARN seleccionados de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523, obtenido a partir de las una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión global del al menos uno o la combinación de microARN a partir de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dichos microARN a partir de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que un cambio en la expresión de al menos uno o la combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523 es indicativo de escoliosis idiopática, en particular AIS.

15

20

25

Preferiblemente, la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática, en particular AIS, que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos hsa-miR-223-5p, obtenido a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión de al menos hsa-miR-223-5p a partir de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de al menos dicho microARN a partir de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que un cambio en la expresión de al menos hsa-miR-223-5p, es indicativo de escoliosis idiopática, en particular AIS.

30

35

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Mapa de calor con agrupación jerárquica de miARN expresados diferencialmente en AIS después de análisis de NGS. Niveles de expresión de miARN seleccionados mediante el análisis de bosque aleatorio y la prueba de Robinson y Smyth. Se han sometido a transformación logarítmica valores de cuentas sin procesar y se han ordenado las muestras según su grupo correspondiente, controles (C) o pacientes con AIS (P).

40

Figura 2. Niveles de expresión relativa de los miARN con representación diferente encontrados en el plasma de pacientes con AIS en comparación con sujetos sanos de control. Diagrama de cajas de niveles de expresión relativa de miARN analizados mediante RT-qPCR normalizados con respecto a miR-191 como control endógeno y calculados utilizando el método de 2-ΔΔCt. a) miR-122 (cambio en veces, FC = 2,5; p < 0,05); b) miR-27a (FC = 1,75; p < 0,05); c) miR-223 (FC = 1,75; p < 0,001); d) miR-1306 (FC = 1,12; p = 0,58); y e) miR-671 (FC = 0,76; p < 0,05). Se han ordenado las muestras según su grupo correspondiente, controles (C) o pacientes con AIS (P). Se aplicó una prueba de la t de muestras independientes. Se consideró que p < 0,05 indicaba una diferencia significativa.

45

50

Figura 3. Análisis de curva de rendimiento diagnóstico de la firma de 4 miARN validado mediante RT-qPCR para el diagnóstico de AIS. El presente modelo utiliza un panel de firma de 4 miARN compuesto por miR-122, miR-27a, miR-223 y miR-1306 alcanzando un valor de AUC de 0,95 (IC: 0,89-1). Cuando se usó el punto de corte óptimo los 4 miARN proporcionaron una susceptibilidad del 92,9% y especificidad del 72,7%.

55

$$\text{Pr (paciente)} = \frac{e^{-7,11+1,50*miR122+1,15*miR27a+6,30*miR223-3,08*miR1306}}{1 + e^{-7,11+1,50*miR122+1,15*miR27a+6,30*miR223-3,08*miR1306}}$$

Ecuación 1. Algoritmo para el cálculo de la probabilidad de padecer escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano según la determinación de los niveles de miARN en circulación.

60

Figura 4. Análisis de curva de rendimiento diagnóstico de la firma de 4 miARN validado mediante RT-qPCR para alto riesgo de curvas graves en AIS. El presente modelo utiliza un panel de firma de 4 miARN compuesto por miR-122, miR-27a, miR-223 y miR-1306 alcanzando un valor de AUC de 0,90 (IC: 0,79-1). Cuando se usó el punto de corte

óptimo al considerar un 50% de probabilidad de alto riesgo, los 4 miARN proporcionaron a una susceptibilidad del 33,3% y especificidad del 84,0%.

$$\text{Pr (alto riesgo)} = \frac{e^{-4,44-1,27*miR122-0,26*miR27a+0,50*miR223+1,04*miR1306}}{1+e^{-4,44-1,27*miR122-0,26*miR27a+0,50*miR223+1,04*miR1306}}$$

5 Ecuación 2. Algoritmo para el cálculo de la probabilidad de recibir un mal pronóstico asociado a curvas de alto riesgo en escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano según la determinación de los niveles de miARN en circulación.

$$\text{Pr (paciente)} = \frac{e^{(-0,067+0,05*miR223+0,03*miR27a-0,01*miR320b+0,02*miR1226+0,03*miR142-0,58*miR4523)}}{1+e^{(-0,067+0,05*miR223+0,03*miR27a-0,01*miR320b+0,02*miR1226+0,03*miR142-0,58*miR4523)}}$$

10 Ecuación 3: Algoritmo para el cálculo de la probabilidad de padecer escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano según la determinación de valores de lecturas normalizadas obtenidos a partir de datos de secuenciación de ARN pequeño.

15 Figura 5. Análisis de curva de rendimiento diagnóstico de miR-122 validado mediante qRT-qPCR para el diagnóstico de AIS. Valor de AUC de 0,6652 (IC: 0,4923-0,8381).

20 Figura 6. Análisis de curva de rendimiento diagnóstico de miR-223 validado mediante qRT-qPCR para el diagnóstico de AIS. Valor de AUC de 0,8764 (IC: 0,767-0,9859). Teniendo en cuenta los valores de susceptibilidad y especificidad obtenidos durante la construcción de ROC, puede obtenerse un valor de susceptibilidad del 80% y especificidad del 75%.

25 Figura 7. Análisis de curva de rendimiento diagnóstico de miR-1306 validado mediante qRT-qPCR para el diagnóstico de AIS. Valor de AUC de 0,5417 (IC: 0,3642-0,7191).

Figura 8. Análisis de curva de rendimiento diagnóstico de miR-27a validado mediante qRT-qPCR para el diagnóstico de AIS. Valor de AUC de 0,6358 (IC: 0,4132-0,8584).

30 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención es la primera que notifica un estudio exhaustivo de miARN en circulación como biomarcadores en pacientes con AIS y controles sanos. Los presentes resultados demuestran que los miARN en circulación en plasma pueden servir como biomarcadores para AIS, proporcionando por tanto un nuevo método para diagnosticar y pronosticar AIS, evitando así la irradiación repetitiva con rayos X para monitorizar la progresión. En este contexto, los autores de la presente invención han encontrado nuevas bio-firmas de miARN representadas de manera significativamente diferencial entre controles y pacientes con AIS. Usando estas bio-firmas seleccionadas basadas en miARN representados diferencialmente, pueden distinguirse pacientes con AIS con alta especificidad y susceptibilidad de sujetos sanos.

40 El método de diagnóstico/pronóstico presentado en el presente documento se basa en epigenética. La regulación de genes epigenéticos se refiere a cómo una configuración estructural y química específica de la cromatina se traduce en un desenlace definido en el estado transcripcional de los genes. En otras palabras, cómo mecanismos moleculares activados por el metabolismo celular, el medio ambiente, la nutrición y el estilo de vida modulan la expresión de los genes. Las intervenciones mencionadas anteriormente tienen un gran impacto en el código epigenético de las células por medio de tres mecanismos importantes que consisten en la metilación del ADN, ARN no codificantes (microARN y ARNnci) y una modificación postraduccional de las histonas (Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics. Ed. Trygve Tollefsbol. Academic Press. Elsevier New York. 2011).

50 En particular, el presente enfoque de diagnóstico/pronóstico se basa en biomarcadores dinámicos (epigenética: microARN o miARN) en lugar de biomarcadores estáticos (genética: SNP), los últimos de los cuales sólo ofrecen una imagen estática de la enfermedad identificando algunos factores genéticos contribuyentes a la enfermedad. La presente invención ofrece por tanto una tecnología de diagnóstico disruptiva en comparación con pruebas de diagnóstico convencionales, incluyendo pruebas de ADN.

55 Específicamente, la presente invención proporciona nuevos marcadores epigenéticos, en particular microARN que pueden contribuir a mejorar la caracterización de pacientes que padecen escoliosis idiopática, en particular AIS, y se basó en primer lugar en un estudio prospectivo basado en un análisis experimental del perfil epigenético de AIS. Se incluyó en el estudio un total de 30 pacientes y 13 sujetos sanos y de este grupo se seleccionó un total de 17
60 pacientes con AIS y 10 sujetos sanos para estudios de secuenciación de nueva generación de miARN (NGS). Para comparar los resultados de NGS de las muestras de pacientes con AIS con las muestras de donantes sanos se calculó un modelo de bosque aleatorio. Los miARN en circulación de pacientes con AIS mostraron patrones de expresión diferencial en comparación con los controles después de un análisis estadístico. De hecho, una firma

formada por 6 miARN pudo distinguir a pacientes de controles proporcionando información molecular sobre la función de estos miARN en esta patología. El modelo de bosque aleatorio para la firma formada por estos 6 miARN logró una precisión sometida a validación cruzada del 100% (susceptibilidad del 100% y sensibilidad del 100%). Dicha bio-firma de 6 miARN consistió en los siguientes biomarcadores: hsa-miR-671-5p, hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-223-5p y hsa-miR-122-5p.

Los miARN hsa-miR-671-5p y hsa-miR-1306-3p estaban subexpresados en pacientes con AIS y los miARN hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-27a-5p estaban sobreexpresados en pacientes con AIS en comparación con individuos sanos. En el caso de hsa-miR-223-5p y hsa-miR-122-5p, estos estaban sobreexpresados de manera homogénea en el plasma de pacientes pero su expresión era heterogénea entre controles.

Además, los autores de la presente invención validaron los resultados anteriores y se dieron cuenta de que un subconjunto de la bio-firma anterior, en concreto una forma de bio-firma mediante hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, proporcionaba un área bajo la curva de 0,95, el 95% entre [0,89, 1] y la sensibilidad de esta prueba fue del 92,9% y su especificidad fue del 72,7%.

Por último, los autores de la presente invención han validado la utilidad de la firma formada por los 6 miARN y subconjuntos específicos de esta firma tales como la forma mediante hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, para predecir la evolución clínica de los pacientes con AIS (véanse los ejemplos y la figura 4).

Una vez que los autores de la presente invención validaron las bio-firmas mencionadas anteriormente, procedieron a realizar una secuenciación de ARN pequeño y un método de regresión logística. Los resultados obtenidos a partir de los datos de secuenciación de ARN pequeño se muestran en el ejemplo 3. Basándose en estos resultados los autores seleccionaron adicionalmente los miARN: hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p, todos ellos estaban regulados por incremento en pacientes en comparación con los controles, y hsa-miR-320b y hsa-miR-4523, regulados por disminución en pacientes en comparación con los controles.

Además, tal como se muestra en el ejemplo 4, los autores identificaron hsa-miR-223 como miARN capaz de distinguir por sí solo casos de controles con un área bajo la curva: 0,8764; IC del 95%: 0,767-0,9859.

Basándose en estos resultados, los autores construyeron diferentes modelos con el fin de elegir las mejores combinaciones de miARN para el diagnóstico de AIS. Con este propósito, los autores seleccionaron diferentes combinaciones de miARN a partir de los miARN descubiertos a partir de secuenciación de ARN pequeño y modelo de regresión logística ("hsa-miR-27a-5p", "hsa-miR-320b", "hsa-miR-1226-5p", "hsa-miR-142-5p", "hsa-miR-4523", "hsa-miR-223") y/o a partir de los validados mediante qRT-PCR anteriormente descubiertos mediante secuenciación de ARN pequeño y método de bosque aleatorio ("hsa-miR-122-5p", "hsa-miR-1306-3p", "hsa-miR-27a-5p", "hsa-miR-223"). Dado que se identificaron "hsa-miR-27a-5p" y "hsa-miR-223" en ambos análisis y hsa-miR-223 era un miARN capaz de distinguir casos de controles por sí solo con un área bajo la curva: 0,8764; IC del 95%: 0,767-0,9859, todas las combinaciones sometidas a prueba analizadas comprendían miR-223.

Se ajustó un modelo de regresión logística y se calculó el valor de AIC (criterio de información de Akaike) para cada combinación posible ($2^7 = 128$ combinaciones). Los autores obtuvieron 10 modelos con los mejores valores de AIC. Los miARN implicados en cada modelo fueron los siguientes:

1. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-1306-3p;
2. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-320b y hsa-miR-4523;
3. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1306-3p;
4. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-142-5p y hsa-miR-1306-3p;
5. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-320b y hsa-miR-142-5p;
6. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1226-5p;
7. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-320b y hsa-miR-1226-5p;
8. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-4523 y hsa-miR-1306-3p;
9. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-4523;
10. hsa-miR-223-5p y hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-20b.

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar escoliosis

idiopática, en particular AIS, en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos uno o más de los microARN seleccionados de la lista que consiste en hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523 obtenidos a partir de las muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión de los uno o más microARN de la muestra biológica del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dichos microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que un cambio en la expresión de cualquiera de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR- 4523 es indicativo de escoliosis idiopática, en particular AIS.

En una realización de este aspecto, la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos hsa-miR-223-5p, obtenido a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión de dicho microARN de la una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dicho microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que un cambio en la expresión de hsa-miR-223-5p es indicativo de escoliosis idiopática, en particular AIS. Preferiblemente, en el que la sobreexpresión o sobrerrepresentación de hsa-miR-223-5p es indicativa de escoliosis idiopática, en particular AIS.

En una realización de este aspecto, la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos los microARN seleccionados de la lista que consiste en cualquiera de las siguientes combinaciones de miARN:

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-1306-3p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-4523;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1306-3p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-1306-3p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-142-5p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1226-5p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-1226-5p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-4523 y hsa-miR-1306-3p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-4523;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-320b;

obtenido a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión de cualquiera de las combinaciones anteriores de microARN a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dicha combinación de microARN a partir de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que un cambio en la expresión de dicha combinación, es indicativo de escoliosis idiopática, en particular AIS.

Se observa que con el fin de realizar la determinación anterior de la presencia de AIS en un sujeto, debe tenerse en cuenta que la totalidad de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR- 142-5p estaban regulados por incremento en pacientes en comparación con los controles, y hsa-miR-320b y hsa-miR-4523 estaban regulados por disminución en pacientes en comparación con los controles.

En una realización de este aspecto, la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos los microARN seleccionados de la lista que consiste en hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, obtenido a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión de la combinación de microARN a partir de la una o más muestras biológicas del

5 sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dicha combinación de microARN a partir de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que un cambio en la expresión de la combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR- 27a-5p y hsa-miR-122-5p es indicativo de escoliosis idiopática, en particular AIS.

10 En una realización de este aspecto, la presente invención incluye un método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos los microARN seleccionados de la lista que consiste en hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, obtenido a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión de la combinación de microARN a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dicha combinación de microARN a partir de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un
15 sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que la sobreexpresión o sobrerrepresentación de la combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR- 223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p es indicativa de escoliosis idiopática, en particular AIS.

20 Preferentemente, en esta realización de la invención, la probabilidad de padecer escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano según el método de la invención, utilizando una muestra de plasma, se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Pr (paciente)} = \frac{e^{-7,11+1,60 \cdot \text{miR122}+1,15 \cdot \text{miR27a}+6,80 \cdot \text{miR223}-3,08 \cdot \text{miR1306}}}{1 + e^{-7,11+1,60 \cdot \text{miR122}+1,15 \cdot \text{miR27a}+6,80 \cdot \text{miR223}-3,08 \cdot \text{miR1306}}}$$

25 Como se utiliza en el presente documento, “sobreexpresión o sobrerrepresentación” de hsa-miR-122-5p, hsa-miR-223-5p, p hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-142-5p se entiende como una expresión mayor de 1,5 en la muestra biológica obtenida a partir de un sujeto humano que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, en comparación con hsa-miR-191 de control endógeno (véase la figura 2). Para los miARN analizados mediante secuenciación de ARN pequeño, se considera “sobreexpresión o sobrerrepresentación” de hsa-miR-122-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-142-5p obtener una FDR <0,5 y logFC positivo (logaritmo de cambio en veces).
30

35 Como se utiliza en el presente documento “sobreexpresión o sobrerrepresentación” de hsa-miR-1306-3p, se entiende como una expresión mayor de 1,1 en la muestra biológica obtenida a partir de un sujeto humano que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, en comparación con hsa-miR-191 de control endógeno (véase la figura 2).

40 Como se utiliza en el presente documento “subexpresión o subrepresentación” de hsa-miR-671-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-4523 se entiende como una expresión menor de 0,8 en la muestra biológica obtenida a partir de un sujeto humano que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, en comparación con hsa-miR-191 de control endógeno (véase la figura 2). Para los miARN analizados mediante secuenciación de ARN pequeño, se considera “subexpresión o subrepresentación” de hsa-miR-671-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-4523 obtener una FDR <0,5 y logFC negativo (logaritmo de cambio en veces).

45 Como se utiliza en el presente documento la “sobreexpresión o sobrerrepresentación” o “subexpresión o subrepresentación” se determinan preferentemente mediante determinación del perfil de expresión por micromatriz, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real de transcriptasa reversa, PCR en tiempo real cuantitativa o secuenciación, en particular secuenciación de ARN pequeño.

50 En otra realización de este aspecto de la invención, el método comprende además el análisis de al menos uno de hsa-miR-671-5p, en comparación con la expresión del sujeto normal, preferiblemente en el que la sobreexpresión o sobrerrepresentación de una combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p y la subexpresión o subrepresentación de hsa-miR-671-5p es indicativa de escoliosis idiopática, en particular AIS.

55 En otra realización de este aspecto de la invención, la una o más muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en uno o más líquidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra tisular o una muestra fecal, preferiblemente una muestra de plasma o sangre.

60 En otra realización, el método es capaz de detectar escoliosis idiopática temprana, en particular AIS. En aún otra realización de este aspecto de la invención, el método comprende un intervalo de confianza que es del 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ó 95% o mayor.

En otra realización de este aspecto de la invención, se mide el nivel de expresión de los microARN mediante determinación del perfil de expresión por micromatriz, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real de

transcriptasa inversa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR de punto final, PCR de punto final en múltiplex, PCR en frío, PCR digital en gotas (ddPCR), PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* en múltiplex o secuenciación de ácido nucleico, en particular secuenciación de ARN pequeño.

5 En un aspecto adicional, la presente invención incluye un método para predecir (pronosticar) la evolución clínica de la escoliosis idiopática, en particular AIS, en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos uno o más de los microARN seleccionados de la lista que consiste en hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, p hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523, obtenido a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión del uno o más microARN de la muestra biológica del sujeto que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dichos microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS) y en el que un cambio en la expresión de al menos uno o más de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523, es indicativo de una mala evolución clínica. El término "una mala evolución clínica" se entiende como la progresión de la enfermedad desde leves deformidades (ángulo de Cobb de entre 10 y 25) hasta curvas moderadas (ángulo de Cobb de entre 25° y 35) en las que los pacientes requieren dispositivo ortopédico, y evolución clínica a curvas intensas (ángulo de Cobb de > 45°) dando por tanto como resultado la corrección quirúrgica de la columna vertebral de los pacientes.

20 En una realización, la presente invención incluye un método para predecir (pronosticar) la evolución clínica de la escoliosis idiopática, en particular AIS, en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos uno o más de los microARN seleccionados de la lista que consiste en hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, obtenido a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión del uno o más microARN de la muestra biológica del sujeto que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dichos microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS) y en el que la sobreexpresión o sobrerrepresentación de al menos uno o más de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y/o hsa-miR-122-5p es indicativa de una mala evolución clínica.

35 Una realización adicional de la presente invención incluye un método para predecir (pronosticar) la evolución clínica de la escoliosis idiopática, en particular AIS, en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos los microARN seleccionados de la lista que consiste en hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, obteniendo a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión de la combinación de microARN de la una o más muestras biológicas del sujeto que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dicha combinación de microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que un cambio en la expresión de la combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p es indicativo de una mala evolución clínica.

45 Una realización adicional de la presente invención incluye un método para predecir (pronosticar) la evolución clínica de la escoliosis idiopática, en particular AIS, en un sujeto humano que comprende las etapas de: obtener una o más muestras biológicas a partir del sujeto que padece escoliosis idiopática, en particular AIS; medir un nivel o patrón de expresión de al menos los microARN seleccionados de la lista que consiste en hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, obtenido a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto; y comparar el patrón de expresión de la combinación de microARN de la una o más muestras biológicas del sujeto que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el patrón de expresión de dicha combinación de microARN de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS, y en el que la sobreexpresión o sobrerrepresentación de la combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p es indicativa de una mala evolución clínica.

55 Preferiblemente, en esta realización de la invención, la probabilidad de obtener una mala evolución clínica según el método de la invención, utilizando una muestra de plasma, se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{Pr (alto riesgo)} = \frac{e^{-4,44 - 1,37 * \text{miR}122 - 0,26 * \text{miR}27a + 2,50 * \text{miR}223 + 1,04 * \text{miR}1306}}{1 + e^{-4,44 - 1,37 * \text{miR}122 - 0,26 * \text{miR}27a + 2,50 * \text{miR}223 + 1,04 * \text{miR}1306}}$$

60 En otra realización de este aspecto de la invención, el método comprende además el análisis de al menos uno de hsa-miR-671-5p, en comparación con la expresión del sujeto normal, preferiblemente en el que la sobreexpresión o sobrerrepresentación de una combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p y la subexpresión o subrepresentación de hsa-miR-671-5p es indicativa de una mala evolución clínica.

En otra realización de este aspecto de la invención, la una o más muestras biológicas se seleccionan del grupo que

consiste en uno o más líquidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra tisular o una muestra fecal, preferiblemente una muestra de plasma. En aún otra realización de este aspecto de la invención, el método comprende un intervalo de confianza que es del 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ó 95% o mayor.

En otra realización de este aspecto de la invención, se mide el nivel de expresión de los microARN mediante determinación del perfil de expresión por micromatriz, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR de punto final, PCR de punto final en múltiplex, PCR en frío, PCR digital en gotas (ddPCR), PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* en múltiplex o secuenciación de ácido nucleico, en particular secuenciación de ARN pequeño.

En otro aspecto de la invención, el método de pronóstico o diagnóstico de la presente invención se usa para tratar a un paciente en riesgo o que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, seleccionar una terapia adecuada para un paciente en riesgo o que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, desarrollar un kit para el diagnóstico de escoliosis idiopática, en particular AIS, o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, los métodos descritos en el presente documento comprenden además la etapa de usar el nivel o patrón de expresión global de los microARN para la orientación del tratamiento o monitorización de la respuesta al tratamiento de la escoliosis idiopática, en particular AIS. Métodos de tratamiento preferidos para pacientes con diagnóstico según los métodos de la presente invención son dispositivos ortopédicos o cirugía. Es muy difícil para los médicos decidir el mejor momento para el tratamiento inicial con dispositivos ortopédicos o cirugía (Cédric Julien KFG, Marie-Yvonne Akoume, Alain Moreau: Towards a Comprehensive Diagnostic Assay for Scoliosis. *Personalized Medicine* 2013, 10(1):97-103). Además, la heterogeneidad genética y fenotípica aumenta claramente la dificultad para estudiar enfermedades complejas tales como AIS. Por tanto, la decisión sobre las mejores terapias para pacientes con AIS se ve adicionalmente complicada.

La prevención de la escoliosis puede ser posible en un futuro cercano mediante terapias farmacológicas diseñadas a medida, lo cual requiere el desarrollo y la validación de pruebas presintomáticas para identificar a niños con riesgo de desarrollar escoliosis. Además, el ejercicio físico también mostró efectos beneficiosos de esta intervención terapéutica en AIS (Bas P, Romagnoli M, Gomez-Cabrera MC, Bas JL, Aura JV, Franco N, Bas T. Beneficial effects of aerobic training in adolescent patients with moderate idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 20 de agosto de 2011; sup. 3: 415-9).

Existe un potencial futuro de estrategias para modular el crecimiento de la columna vertebral como medios de tratamiento de la escoliosis idiopática. Esta modulación puede consistir en la regulación de la expresión génica o ser de naturaleza mecánica. Hasta donde se conoce, no hay ningún fármaco aprobado para el tratamiento de la escoliosis idiopática. Sin embargo, los métodos computacionales usados en los presentes análisis usando los datos obtenidos a partir de secuenciación de ARN pequeño mostraron que los miARN detectados participan en el metabolismo óseo, vinculando de ese modo la epigenética con la etiología de AIS. Los presentes miARN seleccionan como diana genes implicados en el metabolismo óseo, osteoblastogénesis y osteoclastogénesis. Por tanto, los miARN descritos en el presente documento pueden servir para monitorizar el efecto de cualquier terapia futura aplicada para mejorar la AIS, principalmente las dirigidas a la regulación del metabolismo óseo.

Además, hay fármacos que pueden afectar al metabolismo óseo (es decir heparina, warfarina, ciclosporina, glucocorticoides, acetato de medroxiprogesterona, diuréticos de tiazida y derivados de péptidos/proteínas tales como proteínas morfogenéticas óseas, etc.) (Wolinsky-Friedland M. Drug-induced metabolic bone disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1995; 24:395; Davidge Pitts CJ, Kearns AE. Update on medications with adverse skeletal effects. *Mayo Clin Proc* 2011; 86:338). Más recientemente, se ha propuesto el uso de melatonina para prevenir la degradación ósea y fomentar la formación ósea. Resulta importante que la melatonina puede disminuir la expresión de ARNm RANK (H. Koyama, O. Nakade, Y. Takada, T. Kaku, y K.-H. W. Lau, "Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation", *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 17, n.º 7, págs. 1219-1229, 2002). Además, la deficiencia de melatonina induce una curvatura escoliótica y reduce el peso medio y la longitud de las vértebras cervicales, posiblemente debido a una reducción del número total de osteocitos (M. Turgut, S. Kaplan, A. T. Turgut, *et al.*, "Morphological, stereological and radiological changes in pinealectomized chicken cervical vertebrae", *Journal of Pineal Research*, vol. 39, n.º 4, págs. 392-399, 2005).

En todavía otro aspecto de la invención, si el método de diagnóstico de la presente invención indica la presencia de escoliosis idiopática, en particular AIS, en un sujeto, dicho diagnóstico puede confirmarse opcionalmente mediante exploraciones por rayos X. En este sentido, el método de referencia actual para el diagnóstico de AIS consiste en exploraciones por rayos X. Los pacientes que padecen escoliosis se someten en promedio a 23 radiografías en un periodo de 3 años (Knott P, Pappo E, Cameron M, Demauroy J, Rivard C, Kotwicki T, Zaina F, Wynne J, Stikeleather L, Bettany-Saltikov J *et al.* SOSORT 2012 consensus paper: reducing x-ray exposure in pediatric patients with scoliosis. *Scoliosis* 2014, 9:4). Ronckers *et al.* realizaron un seguimiento de 5.513 mujeres que se sometieron a un promedio de 23 radiografías durante el tratamiento y seguimiento de la escoliosis y encontraron que el riesgo de mortalidad era un 46% superior en pacientes con AIS que en la población general, siendo el cáncer la causa principal de muerte en aproximadamente el 23% de los casos (Ronckers CM, Land CE, Miller JS, Stovall M, Lonstein

JE, Doody MM: Cancer mortality among women frequently exposed to radiographic examinations for spinal disorders. *Radiat Res* 2010, 174(1):83-90). Con respecto a esto, existe una necesidad de aumentar el conocimiento sobre los acontecimientos fisiopatológicos que tienen lugar en AIS y el descubrimiento de biomarcadores moleculares para generar nuevas herramientas de diagnóstico precisas y libres de riesgos (Cédric Julien KFG, Marie-Yvonne Akoume, Alain Moreau: Towards a Comprehensive Diagnostic Assay for Scoliosis. *Personalized Medicine* 2013, 10(1):97-103). La presente invención resuelve este problema proporcionando una nueva serie de miARN en circulación en derivados de la sangre que pueden usarse para el diagnóstico de AIS evitando el uso recurrente de exploración por rayos X. Usando cualquiera de las firmas de miARN descritas en el presente documento es posible evitar exploraciones por rayos X repetitivas y usar radiografías de rayos X únicamente para diagnóstico de confirmación y para preparar la intervención quirúrgica.

Aún otro aspecto de la presente invención incluye una bio-firma para la detección o progresión de escoliosis idiopática, en particular AIS, en la que el biomarcador comprende al menos los microARN hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, y cualquiera de las combinaciones de miARN tal como se definieron en el primer aspecto de la invención, y un cambio en la expresión global de cualquiera de las combinaciones de microARN mencionadas anteriormente en una muestra biológica obtenida a partir de un paciente es indicativo de progresión de escoliosis idiopática, en particular AIS, en comparación con la expresión global de los microARN mencionados anteriormente en una muestra biológica obtenida en un punto de tiempo anterior a partir del mismo paciente o indicativo de detección de escoliosis idiopática, en particular AIS, en comparación con la expresión global en una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto sano.

El experto en la técnica reconocerá que lo más habitualmente es que (un ensayo de) una bio-firma incluye la combinación de microARN tanto sobre como subexpresados (representados en líquidos biológicos). Como tal, la presente invención también incluye en determinadas realizaciones la combinación de microARN tanto sobre como subexpresados (o representados) a partir de microARN respectivos. En particular, la bio-firma puede incluir al menos uno de hsa-miR-671-5p y/o hsa-miR-1226-5p.

Aún otro aspecto de la presente invención incluye un kit para diagnosticar y/o predecir (pronosticar) escoliosis idiopática. Este kit puede comprender lo siguiente: (i) cebadores de PCR para determinar cuantitativamente la cantidad de uno o más miARN en una muestra biológica, preferiblemente líquidos biológicos, y más preferiblemente plasma y/o suero. En este sentido, el kit para el diagnóstico y/o pronóstico de escoliosis idiopática puede comprender los cebadores y las sondas necesarios para llevar a cabo cualquiera de las metodologías descritas en los aspectos anteriores de la invención.

Simplemente como ejemplo, se usan dos métodos diferentes para la transcripción inversa: transcripción inversa específica de miARN o universal. Específicamente, en el enfoque específico de miARN, se someten miARN a transcripción inversa usando cebadores de transcripción inversa específicos de tallo-bucle. Los cebadores de tallo-bucle diseñados para un kit útil para el enfoque específico de miARN comprenderán preferiblemente una región que es complementaria a la secuencia conocida en el extremo 3' del miARN, tales regiones útiles tales como las regiones mínimas de los cebadores de tallo-bucle para el kit de la presente invención se ilustran en la siguiente tabla:

	Secuencia	Cebador de retrotranscripción	
		Región	Como sec. mínima
hsa-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGC UUGUGAGCA	TGCTACA	TGC
hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAA GCACUACU	AGTAGTGC	AGT
hsa-miR-223-5p	CGUGUAUUUGACA AGCUGAGUU	AACTCAGC	AAC
hsa-miR-320b	AAAAGCUGGGUUG AGAGGGCAA	TTGCCCTC	TTG

hsa-miR-1226-5p	GUGAGGGCAUGCA GGCCUGGAUGGG G	CCCCATCC	CCC
hsa-miR-1306-3p	ACGUUGGCUCUGG UGGUG	CACCACCA	CAC
hsa-miR-4523	GACCGAGAGGGCC UCGGCUGU	ACAGCCGA	ACA

5 Además, el cebador de tallo-bucle puede contener una parte de cadena sencilla corta, una de cadena doble (el tallo), así como el bucle que contiene la secuencia de unión a cebador universal. De cualquier manera, después se usa el ADNc resultante como molde para RT-PCR cuantitativa con 1 cebador específico de miARN, un segundo cebador universal basado y una sonda de tecnología de PCR TaqMan. Tales cebadores específicos útiles en el kit de la invención se ilustran en la siguiente tabla:

	Secuencia	Cebador directo	
		Región	Como sec. mínima
hsa-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGC UUGUGAGCA	AGGGCTTAGCTGC TT	GGGCTTAGCTG
hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAA GCACUACU	CATAAAGTAGAAAG C	CATAAAGTAGA A
hsa-miR-223-5p	CGUGUAUUUGACA AGCUGAGUU	CGTGTATTTGACAA GC	CGTGTATTTGA C
hsa-miR-320b	AAAAGCUGGGUUG AGAGGGCAA	AAAAGCTGGGTTG AGA	AAAAGCTGGGT T
hsa-miR-1226-5p	GUGAGGGCAUGCA GGCCUGGAUGGG G	GAGGGCATGCAGG C	GCATGC
hsa-miR-1306-3p	ACGUUGGCUCUGG UGGUG	ACGTTGGCTCTGG	ACGTTGGCTCT G
hsa-miR-4523	GACCGAGAGGGCC UCGGCUGU	GACCGAGAGGGCC TCG	AGAGGGC

10 En una realización de este aspecto de la invención, se someten los miARN a retrotranscripción con un cebador universal. Los extremos 3' de los miARN se alargan con una cola de poli(A) o se ligan con un oligonucleótido universal y un oligo(dT) u oligonucleótido universal complementario como cebador de retrotranscripción, respectivamente. La amplificación requiere un cebador específico y un cebador universal. En la siguiente tabla se ilustran ejemplos de cebadores específicos útiles para el kit de la invención:

	Secuencia	Cebador directo	
		Incluye	Como sec. mínima

hsa-miR-27a-5p	AGGGCUUAGCUGC UUGUGAGCA	AGGGCTTAGCTGC TT	GGGCTTAGCTG
hsa-miR-142-5p	CAUAAAGUAGAAA GCACUACU	CATAAAGTAGAAAG C	CATAAAGTAGA A
hsa-miR-223-5p	CGUGUAUUUGACA AGCUGAGUU	CGTGTATTTGACAA GC	CGTGTATTTGA C
hsa-miR-320b	AAAAGCUGGGUUG AGAGGGCAA	AAAAGCTGGGTTG AGA	AAAAGCTGGGT T
hsa-miR-1226-5p	GUGAGGGCAUGCA GGCCUGGAUGGG G	GAGGGCATGCAGG C	GCATGC
hsa-miR-1306-3p	ACGUUGGCUCUGG UGGUG	ACGTTGGCTCTGG	ACGTTGGCTCT G
hsa-miR-4523	GACCGAGAGGGCC UCGGCUGU	GACCGAGAGGGCC TCG	AGAGGGC

- En aún otra realización de este aspecto, la presente invención incluye un kit para un diagnóstico de escoliosis idiopática, en particular AIS, que comprende: reactivos de detección de biomarcador (véase anteriormente como ejemplos de tales reactivos de detección), preferiblemente cebadores y sondas, para determinar un nivel de expresión diferencial de los microARN hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p, en el que la sobreexpresión o sobrerrepresentación de una combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p es indicativa de escoliosis idiopática, en particular AIS, en el que un intervalo de confianza para escoliosis idiopática del adolescente (AIS) es del 90% o mayor.
- 10 En aún otra realización de este aspecto, la presente invención incluye un kit para un diagnóstico de escoliosis idiopática, en particular AIS, que comprende: reactivos de detección de biomarcador (véase anteriormente), preferiblemente cebadores y sondas, para determinar un nivel de expresión diferencial de hsa-miR-223-5p, o combinaciones de microARN seleccionadas de la siguiente lista:
- 15 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-1306-3p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-4523;
- 20 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1306-3p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-1306-3p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-142-5p;
- 25 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1226-5p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-1226-5p;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-4523 y hsa-miR-1306-3p;
- 30 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-4523;
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-320b;
- 35 - hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523; o

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523.

5 En una realización de este aspecto de la invención, el kit comprende además reactivos para la detección y análisis de al menos uno de hsa-miR-671-5p o hsa-miR-1226-5p.

10 En otra realización, además el kit comprende además instrucciones para su uso en el riesgo de diagnóstico de escoliosis idiopática, en particular de AIS, en el que las instrucciones comprenden indicaciones paso a paso para comparar el nivel de expresión de los microARN, cuando se mide la expresión de una muestra obtenida a partir de un sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática, en particular AIS, con el nivel de expresión de una muestra obtenida a partir de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es sujeto sano que no padece escoliosis idiopática, en particular AIS.

15 En otro aspecto, el kit comprende además herramientas, recipientes y reactivos necesarios para obtener muestras a partir de un sujeto seleccionadas del grupo que consiste en uno o más líquidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra tisular o una muestra fecal, preferiblemente en una muestra de plasma.

20 En una realización adicional de este aspecto de la invención, el kit comprende reactivos de detección de biomarcador para determinar un nivel de expresión diferencial de cualquiera de las combinaciones mencionadas anteriormente de cebadores para detectar microARN, tales como cebadores de oligonucleótidos de RT de combinación (tallo-bucle) para reacción de retrotranscripción, dNTP, transcriptasa inversa, tampón, inhibidores de la ARNasa y/o agua libre de nucleasa para retrotranscripción de microARN, y ADN polimerasa, dNTP (sin dUTP),
25 colorante fluorescente como referencia pasiva y preferiblemente cebadores y sondas de oligonucleótidos marcados y tampones de PCR para realizar la reacción de amplificación mediante PCR en un sistema de PCR en tiempo real. Preferiblemente, el kit comprende además un control endógeno tal como hsa-miR-191, que mostró ser estable en la mayoría de las muestras secuenciadas.

30 El kit de la invención puede ser en forma de chip de micromatriz, una tarjeta de microfluidos de q-PCR, un tubo individual de q-PCR, cubas de q-PCR en una tira o una placa de PCR (en formato de 96 ó 384 pocillos).

Todavía otro aspecto de la presente invención se refiere al uso *in vitro* de un kit que comprende reactivos de
35 detección de biomarcador para determinar el nivel de expresión de cualquiera de:

- hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y/o hsa-miR-4523, preferiblemente al menos hsa-miR-223-5p;

40 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-1306-3p;

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-4523;

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1306-3p;

45 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-1306-3p;

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-142-5p;

50 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1226-5p;

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-1226-5p;

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-4523 y hsa-miR-1306-3p;

55 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-4523;

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-320b; o

60 - hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p;

- hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523; o

65 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523;

o cualquier combinación de los mismos,

para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática, en particular AIS, y/o predecir (pronosticar) la evolución clínica de escoliosis idiopática, en particular AIS, en un sujeto humano.

- 5 En una realización preferida de este aspecto, el kit para su uso según este aspecto de la invención es tal como se definió en el aspecto anterior de la invención.

Usos preferidos adicionales del kit son para orientación del tratamiento, o monitorización de la respuesta al tratamiento de escoliosis idiopática, en particular AIS.

- 10 Aún otro aspecto de la presente invención incluye un programa informático adecuado para implementar cualquiera de los métodos de la presente invención. Además, un dispositivo que comprende el programa informático mencionado anteriormente también forma parte de la presente invención, así como su uso para el diagnóstico/pronóstico de la escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano.

- 15 Finalmente se observa que aunque los métodos de diagnóstico y pronóstico descritos en el presente documento se realizan midiendo el patrón de expresión de una bio-firma en una muestra biológica aislada de un sujeto y comparando dicha medida con el patrón de expresión de dicha bio-firma a partir de una muestra biológica de un sujeto normal o sano. Tal comparación también puede realizarse con un nivel o patrón de expresión ya establecido, o usando concentraciones normalizadas y conocidas de miARN sintéticos como valores de referencia. La secuencia de los miARN sintéticos debe contener las secuencias consenso de miARN descritas en la tabla 2.

- 20 Además, se observa adicionalmente que en la técnica anterior se conoce una variedad de métodos estadísticos y matemáticos para establecer el nivel de expresión umbral o de corte. Un nivel de expresión umbral o de corte para un biomarcador particular puede seleccionarse, por ejemplo, basándose en datos a partir de gráficos de rendimiento diagnóstico (ROC). Un experto en la técnica apreciará que estos niveles de expresión umbral o de corte pueden hacerse variar, por ejemplo, moviéndose a lo largo del gráfico de ROC para un biomarcador particular o combinaciones de los mismos, para obtener diferentes valores para la susceptibilidad o especificidad afectando de ese modo al rendimiento de ensayo global. Por ejemplo, si el objetivo es tener un método de diagnóstico robusto desde un punto de vista clínico, debe intentarse tener una alta susceptibilidad. Sin embargo, si el objetivo es tener un método económico, debe intentarse obtener una alta especificidad. El mejor punto de corte se refiere al valor obtenido a partir del gráfico de ROC para un biomarcador particular que produce la mejor susceptibilidad y especificidad. Los valores de sensibilidad y especificidad se calculan a lo largo del intervalo de umbrales (puntos de corte). Por tanto, los valores de umbral o punto de corte pueden seleccionarse de tal manera que la susceptibilidad y/o especificidad son de al menos aproximadamente el 70%, y pueden ser, por ejemplo, de al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 100% en al menos el 60% de la población de pacientes sometida a ensayo, o en al menos el 65%, el 70%, el 75% o el 80% de la población de pacientes sometida a ensayo.

- 40 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que simplemente ilustran la invención y no la limitan.

Ejemplos

- 45 Ejemplo 1. Material y métodos

Diseño del estudio y población

- 50 Este estudio es un estudio prospectivo basado en un análisis experimental del perfil epigenético de AIS. Pacientes entre 12 y 18 años de edad, con diagnóstico de AIS con un ángulo de Cobb $> 15^\circ$ y escoliosis marcada, lumbago y sin síntomas neurológicos.

- 55 Los criterios de inclusión para el grupo de pacientes fueron con diagnóstico de AIS con un ángulo de Cobb $> 15^\circ$ y escoliosis marcada, seguimiento mínimo durante dos años, sin tratamiento quirúrgico previo, radiografías disponibles, entre 12-18 años de edad.

- Los criterios de exclusión fueron: fumador, proceso infeccioso o inflamatorio activo durante la extracción, ingesta de antioxidantes, patología neurológica, patología de síndrome congénito y pacientes con escoliosis debida a causas secundarias.

- 60 En este estudio, se incluyeron sujetos afectados por AIS y sujetos sanos en el estudio después de la aprobación del comité ético y la firma de un consentimiento informado. También se recogió un consentimiento informado para crear un repositorio público de muestras de AIS en el biobanco del CIBERER (www.ciberer-biobank.es).

- 65 Exploraciones físicas y radiológicas

El examen físico consistió en la medición de los siguientes parámetros: edad, sexo e índice de masa corporal (IMC) (Kg/cm²).

5 Se realizó una exploración neurológica completa, incluyendo equilibrio motor y sensorial, reflejos abdominales así como reflejos plantares y de Aquiles.

Evaluación del equilibrio coronal y sagital con la prueba de la plomada.

10 Evaluación de la rotación vertebral mediante la prueba de Adam usando el escoliómetro de la Sociedad de Investigación de Escoliosis (SRS) y finalmente evaluación clínica de la deformidad usando formulario de evaluación clínica estética de tronco (TRACE) que consiste en la evaluación de la asimetría de hombro, escápula, torácica y pélvica. La evaluación física para el grupo control fue la misma excluyendo el formulario de TRACE.

15 Se realizó un estudio radiológico a todos los pacientes incluidos, basándose en dos radiografías de pie, en vistas anteroposterior y lateral. Era obligatorio incluir desde el cráneo hasta la pelvis. Se utilizó el método de Risser para determinar la madurez esquelética mientras que se usó el método de Cobb para medir la deformidad coronal. En el plano sagital, se midieron la cifosis T5-T12 (se asignaron valores normales desde 10° hasta 40°), la lordosis T12-S1 (se asignaron valores normales desde 37° hasta 47°), la incidencia pélvica (valores normales de 47°-57°) y la inclinación pélvica (valores normales de 9°-15°). Por último, se tuvieron en cuenta el equilibrio coronal (líneas C7-CSVL) y sagital (líneas C7-S1). Según los criterios de la SRS, para el presente estudio, se consideró el diagnóstico de escoliosis cuando el valor coronal de la deformidad era de hasta 10 grados de Cobb. También se recopiló la clasificación de la deformidad para cada paciente usando el sistema de clasificación de Lenke para escoliosis (tabla 1).

25 Tabla 1. Clasificación de Lenke de pacientes que participaron en este estudio

	N	%, cohorte	Descripción
<u>Lenke</u>			
1	8	60	Ángulo de Cobb medio de 34° (intervalo 14-80)
2	1	3,3	La curva de PT era de 30° y la curva de MT torácica principal era de 32°
3	3	10	La curva de MT media era de 42,33° mientras que la curva de TL/L era de 33°
4	0	0	
5	5	16,7	La curva de TL/L media era de 26,36 ^a
6	3	10	El ángulo de Cobb medio era de 29,6° de la curva de MT y de 38,7° para la curva de TL/L

PT: curva torácica proximal; MT: curva torácica principal; TL/L: curva toracolumbar/lumbar

30 Finalmente, todos los individuos incluidos completaron cuestionarios sobre escoliosis y salud general, específicamente SRS-22, CAVIDRA y SF-36 para el grupo de pacientes y SF-36 para el grupo control.

35 Puesto que no hay ninguna explicación clara sobre el origen de AIS y simplemente el análisis genético no explica completamente la fisiopatología y el pronóstico de AIS, se evaluaron reguladores epigenéticos mediante secuenciación de nueva generación.

40 Se purificaron los miARN y se analizaron mediante secuenciación de nueva generación los miARN en circulación de pacientes con AIS (n = 17) y de sujetos sanos (n = 10) y mediante RT-qPCR los niveles de miARN de pacientes con AIS (n = 30) y de sujetos sanos (n = 30).

Extracción de ARN y cuantificación

45 Se extrajeron muestras de sangre de pacientes con AIS y sujetos sanos en tubos con EDTA. Se centrifugó cada muestra a 2500 RPM durante 10 minutos para separar el plasma y luego se almacenó a -80°C hasta la extracción de ARN. Se aisló ARN pequeño a partir de 500 ul de plasma utilizando un kit miRNAeasy (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. Se eluyeron ARN pequeños con 50 µl de agua libre de ARNasa. Se cuantificó la concentración de ARN pequeño usando un espectrofotómetro de UV NanoDrop ND 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE.UU.).

50 Secuenciación de miARN

Preparación de la biblioteca

Se construyeron bibliotecas de ADNc usando Ion Total RNA-Seq Kit v2 de Life Technologies (n.º de cat. 4479789) y el protocolo recomendado por el fabricante. Se hicieron pasar muestras de miARN purificadas en una plataforma basada en microfluidos, Agilent 2100 Bioanalyzer, para evaluar el rendimiento y la distribución de tamaño de los miARN. Se hibridaron 15 ng de miARN con adaptadores de iones en un termociclador durante 10 minutos a 65°C y 5 minutos a 30°C. Después se incubó el miARN hibridado durante 30 minutos a 30°C con ligasa para ligar los adaptadores. Después se mezclaron las muestras hibridadas con una mezcla maestra de transcriptasa inversa y se incubaron a 42°C durante 30 minutos para generar bibliotecas de ADNc. Se purificaron las bibliotecas de ADNc usando perlas de unión a ácido nucleico, tampones de ácido nucleico y protocolo normalizado de Life Technology Ambion (n.º de cat. 4479681). Después se amplificaron las bibliotecas de ADNc purificado mediante PCR usando cebadores inverso y directo Platinum PCR Super-Mix High Fidelity e Ion Xpress Barcode con las siguientes condiciones: etapa 1: 95°C durante 2 minutos; etapa 2: 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos para 2 ciclos; etapa 3: 94°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos, 68°C durante 30 segundos para 16 ciclos; etapa 4: 68°C durante 5 minutos. Se purificaron las bibliotecas de ADNc amplificadas utilizando perlas de unión a ácido nucleico, tampones de unión y ejecución en un dispositivo Agilent 2100 Bioanalyzer para determinar el rendimiento y la distribución de tamaño de cada biblioteca.

Formación de moldes, enriquecimiento y secuenciación

Se usaron aproximadamente 10 pM de bibliotecas de código de barras combinadas para formar moldes usando Life Technologies Ion PI Template OT2 Solutions 200 Kit v3 (n.º de cat. 4488318) y el protocolo recomendado por el fabricante. En resumen, se mezclaron 10 pM de bibliotecas combinadas con mezcla de reactivos TL de Ion PI, reactivo B de Ion PI PCR, mezcla de enzimas TL de Ion PI y partículas esféricas de Ion PI v3. Se agitaron las mezclas con vórtex y se cargaron cargadas en un conjunto de filtro de reacción de Ion PI Plus y se ajustaron en un instrumento Ion One Touch 2 (Life Technologies). Se encendió el instrumento y se hizo funcionar durante 6,5 horas. Tras la ejecución, se aislaron las perlas y se realizó una evaluación de la calidad en un instrumento Quid para determinar el % de perlas que eran policlonales. Después de la evaluación policlonal se enriquecieron las muestras utilizando Ion PI Template OT2 Solutions 200 Kit v3 (n.º de cat. 4488318), un instrumento Ion OneTouch ES y un protocolo proporcionado por el fabricante. Después del enriquecimiento, se lavaron las perlas y se prepararon para la secuenciación. Después se cargaron las perlas en un chip Ion P1 previamente preparado y calibrado como se indica en el protocolo de Ion P1 Sequencing 200 Kit v3 de Life Technologies. Después se colocó el chip cargado en un secuenciador Ion Proton y se inició la ejecución usando un plan de ejecución Ion torrent miRNAseq que se configuró basándose en el tipo de biblioteca, especie, número de flujos de ejecución requeridos, tipo de conexión requerida, recorte de adaptador así como otros parámetros específicos para la ejecución de miRNAseq.

Alineamiento y análisis de datos

Después de completarse la ejecución de protones, se alinearon las secuencias sin procesar con la secuencia de referencia de construcción Hg19 humana de Life Technologies Ion Torrent Suite. Se usaron los archivos BAM alineados para el análisis posterior. Se subieron los archivos BAM, separados por códigos de barras específicos, al software Strand NGS (San Francisco, CA). Se evaluó el control de calidad mediante el programa Strand NGS, que determinó la calidad pre y post-alineación de las lecturas para cada muestra. Después se filtraron las lecturas alineadas basándose en una puntuación de alineación, cuentas de coincidencias, calidad de mapeo y calidad de bases promedio. Después de filtrar, se normalizaron las lecturas alineadas y se cuantificaron usando el algoritmo de Deseq mediante el programa Strand NGS.

Modelado estadístico

En primer lugar, se realizó la normalización Deseq con los datos de cuentas sin procesar, estimando factores de tamaño utilizando las medias geométricas de las cuentas de transcripción. Después de la normalización, se aplicó una transformación de estabilización de varianza (VST) antes del modelado. Se utilizó un algoritmo de bosque aleatorio como clasificador para el presente modelo, y se evaluó el rendimiento del modelo usando veinte repeticiones de validación cruzada de 10 veces. La selección de biomarcadores se basó en la importancia de variables notificada por el algoritmo de bosque aleatorio utilizando un valor de corte de 0,15 basándose en un gráfico de tamizado con todas las variables ordenadas de valores más importantes a menos. Además, también se realizó un análisis de expresión diferencial basándose en la distribución binomial negativa usando la prueba binomial negativa exacta de Robinson y Smyth y aplicando una corrección de tasa de falso descubrimiento a los valores de p obtenidos. Antes de realizar las pruebas, se ajustaron las muestras a un tamaño de biblioteca efectivo igual mediante reducción de cuentas sin procesar. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software R (versión 3.1.2) y los paquetes de R DESeq2 (versión 1.6.3), MLSeq (versión 1.2.0) y NBPSeq (versión 0.3.0).

Validación mediante qPCR en tiempo real de una nueva firma de miARN a partir de plasma de pacientes con AIS y controles sanos

Se realizaron reacciones de transcripción inversa usando el kit de transcripción inversa de miARN de TaqMan y cebadores de tallo-bucle específicos de miARN (n.º de parte 4366597, Applied Biosystems, Inc.) y 100 ng de ARN libre de células de entrada en 15 µl de reacción de RT. Se realizaron reacciones de PCR en tiempo real por

triplicado, en volúmenes de de reacción de 10 μ l a escala reducida usando 5 μ l de mezcla maestra para PCR universal de TaqMan 2x sin UNG, 0,5 μ l de ensayo de ARN pequeño de TaqMan (20x) [hsa-miR-122-5p (002245); hsa-miR-27a-5p (002445); hsa-miR-223-5p (002098); hsa-miR-1226-5p (002758); hsa-miR-1306-3p (241056_mat); hsa-miR-671-5p (197646_mat); hsa-miR-191-5p (002299)], 3,5 μ l de agua libre de nucleasa y 1 μ l de producto de RT. Se llevó a cabo PCR en tiempo real en un termociclador Applied BioSystems 7900HT (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) programado de la siguiente manera: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min seguido por 45 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Se analizaron los datos sin procesar con el software Expression Suit versión 1.0.3 (Life Technologies).

10 Ejemplo 2. Resultados

Descripción clínica de pacientes con AIS

Se incluyó un total de 30 pacientes y 13 sujetos sanos en el presente estudio de investigación. En el grupo de pacientes la edad media era de 15,02 años (intervalo de 12-18). La razón de hombres / mujeres era de 5:1, respectivamente. El valor medio del IMC de este grupo era de $19,84 \pm 3,03$. La historia familiar era positiva en 13 pacientes, que representan el 43,33% del grupo total. La edad media en el diagnóstico era de 10,65 años (intervalo de 8-18). Como se mencionó anteriormente, el seguimiento mínimo era de dos años. La edad media de menarquía era de 12,26 años (intervalo de 10-15). En el momento del análisis de sangre 2 pacientes femeninas aún no tenían la menarquía.

Desde la perspectiva clínica, la puntuación TRACE media era de 6,6 (intervalo de 4-10). El valor de la prueba de plomada coronal media era de 1,18 cm (intervalo de 0-2,25). Usando un escoliómetro, en la prueba de Adam, la prominencia media medida era de 6,76° para tronco torácico y de 4,41° para el segmento lumbar. La exploración neurológica fue normal en todos los pacientes.

Teniendo en cuenta los resultados radiológicos, la madurez esquelética media mediante el método de Risser era de 3,46 (intervalo de 1-5). Se clasificó a los pacientes siguiendo la clasificación de Lenke.

Por otro lado, las medidas medias en el plano sagital fueron cifosis media de T5-T12 de $23,06^\circ \pm 11,21$ (intervalo de 4-42) y lordosis media T12-S1 de $56,46^\circ \pm 11,10$ (intervalo de 34-82), mientras que los valores pélvicos fueron de $46,77^\circ$ como incidencia pélvica media (intervalo de 28-64) y $11,2^\circ$ como inclinación pélvica media (intervalo de 1-28) (tabla 1). El valor medio de desequilibrio coronal radiológico en el grupo de pacientes fue 1,05 cm (intervalo de 0-4,2), mientras que el desequilibrio sagital medido en radiografías fue de -0,15 cm (intervalo de -0,88 / +0,10). La evaluación de cuestionarios de salud general y específicos de escoliosis mostró que la puntuación media para SRS-22 fue de 4,12 puntos (intervalo de 2,54-5), 39,64 puntos en la prueba de CAVIDRA (intervalo de 21-71) y finalmente un resultado medio de 83,56 puntos (intervalo de 39,58-98-05) en el formulario SF-36.

Por otro lado, 13 individuos sanos componían el grupo de control. Tal como se mencionó anteriormente, se excluyó clínica y radiológicamente cualquier signo de escoliosis.

La edad media en este grupo fue de 13,69 años (intervalo de 12-18). En contraste con el grupo de pacientes, la razón de hombres / mujeres fue más equilibrada, 1:1,17, respectivamente. El IMC medio medido era de $20,4 \pm 2,54$ (intervalo de 17,17-23,5). Cinco individuos tenían historia familiar positiva de escoliosis idiopática, lo que significa un 38,46%. De un total de 6 niñas, tres de ellas aún no habían tenido la menarquía.

La exploración física mostró valores medios en la prueba de la plomada coronal de 0,26 cm (intervalo de 0-2), de joroba torácica de 0,7° (intervalo de 0-5), mientras que el valor medio de joroba lumbar era de 1° (intervalo de 0-4). Se determinó una exploración neurológica normal para todos los individuos.

En cuanto a los resultados de radiografías, la evaluación Risser fue de 2,46 (intervalo de 0-5). En la vista anteroposterior el ángulo de Cobb medio medido fue de $2,23^\circ$ (intervalo de 0-8). El análisis radiológico sagital mostró una cifosis de T5-T12 media de $34,92^\circ$ (intervalo de 18-52) y una lordosis de T12-S1 media de $63,46^\circ$ (intervalo de 40-79). Clínica o radiológicamente no se detectó ningún desequilibrio coronal o sagital. Esta vez los parámetros pélvicos eran de una incidencia pélvica media de $43,92^\circ$ (intervalo de 33-54) y una inclinación pélvica media de $8,8^\circ$ (intervalo de 4,5-15). El formulario SF-36 dio como resultado una puntuación media de 85,93 puntos (72,77-96,8).

Se seleccionó un total de 17 pacientes con AIS (edad: 15 ± 2 años; IMC: $19,6 \pm 2,7 \text{ kg/m}^2$) y 10 sujetos sanos (edad: 14 ± 2 años; IMC: $20,4 \pm 2,5 \text{ Kg/m}^2$) para estudios de secuenciación de nueva generación de miARN. En ese caso, la curva principal media de los pacientes era de $42,8^\circ \pm 18,3$ (ángulo de Cobb), la cifosis fue de $19,6^\circ \pm 10,3$, y la lordosis fue de $52,3^\circ \pm 12,5$ (tabla 1). De esta serie, 7 pacientes con AIS mostraron una evolución agresiva, mientras que 2 pacientes mostraron una evolución moderada y 6 pacientes una benigna. 2 pacientes con AIS no se definieron.

65 Identificación de miARN expresados diferencialmente mediante NGS

Para comparar los resultados de NGS de las muestras de pacientes con AIS con las muestras de donantes sanos, en primer lugar se calculó un modelo de bosque aleatorio.

5 Los miARN en circulación de pacientes con AIS mostraron patrones de expresión diferencial en comparación con los controles tras análisis estadístico utilizando R. Una firma formada por 6 miARN fue capaz de distinguir a los pacientes de los controles proporcionando información molecular sobre la función de estos miARN en esta patología. El presente modelo de bosque aleatorio logró una precisión sometida a validación cruzada del 100% (susceptibilidad del 100% y sensibilidad del 100%). Se seleccionaron miR-122-5p, miR-671-5p, miR-223-5p, miR-1226-5p, miR-27a-5p y miR-1306-3p como los factores de predicción más importantes de la enfermedad. Los resultados del presente modelo se representan en un mapa de calor (figura 1).
10

Tabla 2. miARN seleccionados como biomarcadores para AIS

Nombre de miARN	Secuencia madura	Registro
hsa-miR-671-5p	aggaagcccuggagggcuggag	MIMAT0003880
hsa-miR-1306-3p	acguuggcucugguggug	MIMAT0005950
hsa-miR-1226-5p	gugagggcaugcaggccuggaugggg	MIMAT0005576
hsa-miR-27a-5p	agggcuuagcugcuugugagca	MIMAT0004501
hsa-miR-223-5p	cguguauuugacaagcugaguu	MIMAT0004570
hsa-miR-122-5p	uggagugugacaauugguguuug	MIMAT0000421

15 A partir de los resultados de NGS se detectó que miR-671-5p y miR-1306-3p estaban subexpresados y miR 1226-5p y miR 27a-5p estaban sobreexpresados en pacientes, en comparación con los controles. En el caso de miR 223-5p y miR 122-5p, estaban sobrerrepresentados de manera homogénea en el plasma de los pacientes pero su expresión era heterogénea entre los controles. Los resultados de la prueba binomial negativa exacta de Robinson y Smyth reforzaron los desenlaces del presente modelo de bosque aleatorio, ya que tres de los miR anteriormente seleccionados también mostraron una expresión diferencial estadísticamente significativa entre los grupos: miR 122-5p (p = 0,005), miR 671-5p (p = 0,005) y miR 223-5p (p = 0,01).
20

Validación de la firma miARN mediante RT-qPCR

25 Para validar la firma se empleó RT-qPCR y se incluyeron no sólo pacientes con AIS adicionales, sino también sujetos sanos adicionales. En total se analizó la firma de 6 miARN en 60 muestras (cohorte de validación). A lo largo de este estudio de validación se constató que un subconjunto de anterior bio-firma de 6 miARN anterior, en concreto una forma de bio-firma de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p proporcionaba un área bajo la curva de 0,95, el 95% entre [0,89, 1] y la sensibilidad de esta prueba fue del 92,9% y su especificidad fue del 72,7% (como se muestra en la figura 3). Además, esta misma bio-firma resultó adecuada para predecir la evolución clínica de los pacientes con AIS (como se muestra en la figura 4).
30

De hecho, la figura 3 muestra un análisis de curva de rendimiento diagnóstico de la firma de 4 miARN, validada mediante RT-qPCR para el diagnóstico de AIS. El presente modelo utiliza un panel de firma de 4 miARN compuesta por miR-122, miR-27a, miR-223 y miR-1306 que logra un valor AUC de 0,95 (IC: 0,89-1). Cuando se utiliza el punto de corte óptimo la totalidad de los 4 miARN proporcionaron una susceptibilidad del 92,9% y especificidad del 72,7%.
35

$$\text{Pr (paciente)} = \frac{e^{-7,11+1,50 \cdot \text{miR}122+1,15 \cdot \text{miR}27a+6,30 \cdot \text{miR}223-3,08 \cdot \text{miR}1306}}{1 + e^{-7,11+1,50 \cdot \text{miR}122+1,15 \cdot \text{miR}27a+6,30 \cdot \text{miR}223-3,08 \cdot \text{miR}1306}}$$

40 Ecuación 1. Algoritmo para el cálculo de la probabilidad de padecer escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano según la determinación de niveles de miARN en circulación mediante la firma de 4 miARN

La figura 4 muestra un análisis de curva de rendimiento diagnóstico de la firma de 4 miARN validada mediante RT-qPCR para alto riesgo de curvas intensas en AIS. El presente modelo utiliza un panel de firma de 4 miARN compuesta por miR-122, miR-27a, miR-223 y miR-1306 que logra un valor de AUC de 0,90 (IC: 0,79-1). Cuando se utiliza el punto de corte óptimo, considerando un 50% de probabilidad de alto riesgo, la totalidad de los 4 miARN proporcionaron una susceptibilidad del 33,3% y especificidad del 84,0%.
45

$$\text{Pr (alto riesgo)} = \frac{e^{-4,44-1,37 \cdot \text{miR}122-0,26 \cdot \text{miR}27a+2,50 \cdot \text{miR}223+1,04 \cdot \text{miR}1306}}{1 + e^{-4,44-1,37 \cdot \text{miR}122-0,26 \cdot \text{miR}27a+2,50 \cdot \text{miR}223+1,04 \cdot \text{miR}1306}}$$

50 Ecuación 2. Algoritmo para el cálculo de la probabilidad de recibir un mal pronóstico asociado a curvas de alto riesgo en escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano según la determinación de niveles de miARN en circulación

Ejemplo 3. Resultados obtenidos a partir de datos de secuenciación de ARN pequeño

1. Procesamiento, alineación y cuantificación de las lecturas.

5 Se realizaron comprobaciones de control de calidad iniciales para conocer si los datos requerían filtrado para eliminar contaminación de ARN ribosómico (ARNr), si las lecturas de secuencia requerían “recorte” para eliminar bases de baja calidad y si había necesidad de recortar lecturas para eliminar adaptadores de secuenciación. Basándose en los resultados obtenidos, se recortaron las lecturas de secuencia para eliminar adaptadores de secuenciación y bases de baja calidad a partir del extremo 3’ con un umbral de calidad Phred de menos de 20.

10 Finalmente, se descartaron las lecturas con una longitud de menos de 18 nucleótidos. Se realizó una nueva ejecución de FastQC para garantizar que las etapas anteriores de recorte de calidad y/o eliminación de adaptador conservaban satisfactoriamente lecturas de alta calidad sin ser demasiado rigurosas y sin introducir ningún nuevo sesgo técnico aparente.

15 El software usado para realizar la comprobación de control de calidad y la eliminación de adaptadores/filtrado de lecturas fueron FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) y cutadapt (<http://cutadapt.readthedocs.org/en/stable/>), respectivamente. Una vez que se consideró que los datos tenían una calidad suficiente, se mapearon todos los datos frente a la secuencia de referencia de construcción de Hg38 humana, tomada a partir del explorador de genoma de UCSC. Tras el mapeo, se realizó la intersección entre la posición alineada de las lecturas y las coordenadas de los miARN tomadas a partir de miRBase v21. Se realizaron etapas de alineación y cuantificación usando los paquetes Subread (Liao Y, Smyth GK y Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*, 41(10): e108, 2013 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558742>) y RSubread (Liao Y, Smyth GK y Shi W. featureCounts: an efficient general-purpose program for assigning sequence reads to genomic features, *Bioinformatics*, 30 de noviembre de 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227677>), respectivamente.

2. Análisis de algoritmo de diagnóstico a partir de datos de secuenciación de ARN pequeño

30 Se realizó un análisis de expresión diferencial de miARN entre pacientes con AIS y controles. Previamente, se eliminaron mediante filtrado los miARN sin ninguna cuenta en cualquiera de las muestras. Dado que el tamaño de grupo más pequeño era de 9, se mantuvieron los miARN que lograron al menos una cuenta por millón (cpm) en al menos 9 muestras. Después de eso, se normalizaron los datos de expresión usando el enfoque de factores de corrección por medio del método de TMM (Robinson, MD, y Oshlack, A (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology*. 2010; 11: R25). También se estimaron dispersiones específicas de miARN con un método de probabilidad máxima condicional ajustada por cuantiles (qCML) (Robinson, MD, y Smyth, GK (2007). Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. *Bioinformatics* 23, 2881 - 2887). Se realizó un análisis de expresión diferencial usando la prueba exacta (Robinson, MD y Smyth, GK (2008). Small sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* 9, 321-332).

40 Como resultado, se obtuvieron 18 miARN desregulados (FDR < 0,05), 6 estaban regulados por incremento y 12 regulados por disminución en pacientes con AIS en comparación con los controles. Tomando los 11 miARN con una FDR < 0,01 como variables y las 25 muestras como observaciones, se ajustó un modelo de regresión logística de LASSO con distribución binomial (Friedman J., Hastie T., y Tibshirani R., Regularization Paths for Generalized linear models via coordinate Descent. *J Statistical Software*, 2010; 33(1): 1-22). Se evaluaron los miARN más importantes derivados del modelo usando una validación cruzada dejando uno fuera. Se seleccionaron los miARN que tenían coeficientes distintos de cero en el valor de λ que dio el error sometido a validación cruzada medio mínimo. Los miARN seleccionados fueron: hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p, todos ellos estaban regulados por incremento, y hsa-miR-320b, hsa-miR-4523 estaban regulados por disminución en pacientes en comparación con los controles. Se calculó el algoritmo usando datos de lectura normalizados con el método de TMM. Los valores de sensibilidad (Sn), especificidad (Sp) y área bajo la curva (AUC) obtenidos usando el presente modelo fueron de 1 con un intervalo de confianza (IC) del 95%.

$$55 \text{ Pr (paciente) } = \frac{e^{(-0.067 + 0.06 \cdot \text{miR223} + 0.03 \cdot \text{miR27a} - 3.01 \cdot \text{miR320b} + 0.02 \cdot \text{miR1226} + 0.03 \cdot \text{miR142} - 0.58 \cdot \text{miR4523})}}{1 + e^{(0.067 + 0.06 \cdot \text{miR223} + 0.03 \cdot \text{miR27a} - 3.01 \cdot \text{miR320b} + 0.02 \cdot \text{miR1226} + 0.03 \cdot \text{miR142} - 0.58 \cdot \text{miR4523})}}$$

Ecuación 3: Algoritmo para el cálculo de la probabilidad de padecer escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano según la determinación de valores de lecturas normalizadas obtenidos a partir de datos de secuenciación de ARN pequeño.

60 Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software R (versión 3.3.0) y los paquetes de R EdgeR (versión 3.12.0), glmnet (versión 2.0-2), glmulti (versión 1.0.7) y pROC (versión 1.8).

Ejemplo 4. Datos normalizados de Cts con miARN: miR-122, miR-27a, miR-223 y miR-1306, para diagnosticar AIS en muestras de casos (muestras de AIS) y de controles (sujetos sanos).

1. Sensibilidad y especificidad de miR-122 para diagnosticar AIS en muestras de casos (muestras de AIS) y controles (sujetos sanos)

5 **No se consideró que fuera significativo

Coefficientes:

(Ordenada en el origen)	Estimación	Error est.	Valor de z	Pr(> z)
miR.122	-0,2194	0,6928	-0,317	0,752
	0,7756	0,5153	1,505	0,132

10 **A continuación se muestran los valores de sensibilidad para cada valor de especificidad. Aunque se calcularon los valores de sensibilidad mínima (se. baja), máxima (se.alta) y mediana (se. mediana), se aconseja tomar los valores de la mediana.**

sp	se.baja	se.mediana	se.alta
0,0	1,0000	1,0000	1,0000
0,1	0,7241	0,8966	1,0000
0,2	0,6552	0,8621	0,9724
0,3	0,5862	0,8276	0,9655
0,4	0,5517	0,7931	0,9311
0,5	0,4828	0,7241	0,9310
0,6	0,2997	0,6483	0,8621
0,7	0,2414	0,5724	0,8276
0,8	0,2068	0,4299	0,7586
0,9	0,1722	0,3483	0,6760
1,0	0,1379	0,2759	0,5517

15 **A continuación se muestran los valores de especificidad para los valores de sensibilidad. Aunque se calcularon los valores de especificidad mínima (sp.baja), máxima (sp.alta) y mediana (sp.mediana), se aconseja tomar los valores de la mediana.**

se	sp.baja	sp.mediana	sp.alta
0,0	1,00000	1,00000	1,0000
0,1	1,00000	1,00000	1,0000
0,2	0,80000	1,00000	1,0000
0,3	0,61920	1,00000	1,0000
0,4	0,50000	0,83330	1,0000
0,5	0,41670	0,75000	1,0000
0,6	0,25000	0,66670	0,9167
0,7	0,08333	0,50000	0,8793
0,8	0,00000	0,33330	0,7500
0,9	0,00000	0,08333	0,5000
1,0	0,00000	0,00000	0,1667

20 Área bajo la curva: 0,6652

IC del 95%: 0,4923-0,8381 (DeLong) (véase la figura 5)

2. Sensibilidad y especificidad de miR-223 para diagnosticar casos y controles.

25

**Se consideró significativo

sp	se.baja	se.mediana	se.alta
0,0	1,0000	1,0000	1,0000
0,1	0,9310	1,0000	1,0000
0,2	0,8621	1,0000	1,0000
0,3	0,8276	1,0000	1,0000
0,4	0,7931	0,9655	1,0000
0,5	0,7922	0,9310	1,0000
0,6	0,6552	0,8966	1,0000
0,7	0,5862	0,8621	1,0000
0,8	0,4828	0,7931	0,9655
0,9	0,3793	0,7241	0,9655
1,0	0,3448	0,5862	0,8966

ES 2 734 803 T3

se	sp.baja	sp.mediana	sp.alta
0,0	1,00000	1,0000	1,0000
0,1	1,00000	1,0000	1,0000
0,2	1,00000	1,0000	1,0000
0,3	1,00000	1,0000	1,0000
0,4	0,83330	1,0000	1,0000
0,5	0,75000	1,0000	1,0000
0,6	0,75000	0,9167	1,0000
0,7	0,58330	0,9167	1,0000
0,8	0,33330	0,7500	1,0000
0,9	0,16670	0,5000	0,9167
1,0	0,08333	0,3333	0,7500

Área bajo la curva: 0,8764

5 IC del 95%: 0,767-0,9859 (DeLong) (véase la figura 6)

3. Sensibilidad y especificidad de miR-1306 para diagnosticar casos y controles.

**No se consideró que fuera significativo

10

Coeficientes:

(Ordenada en el origen)	Estimación	Error est.	Valor de z	Pr(> z)
miR.1306	0,80536	0,64215	1,254	0,210
	0,07596	0,53881	0,141	0,888

sp	se.baja	se.mediana	se.alta
0,0	1,00000	1,00000	1,0000
0,1	0,67590	0,86210	0,9655
0,2	0,58620	0,80000	0,9448
0,3	0,49380	0,72780	0,9034
0,4	0,40000	0,65060	0,8648
0,5	0,32510	0,57470	0,7980
0,6	0,26010	0,49030	0,7471
0,7	0,20170	0,38210	0,6759
0,8	0,13790	0,26620	0,5931
0,9	0,07094	0,15170	0,3724
1,0	0,00000	0,03448	0,1034

se	sp.baja	sp.mediana	sp.alta
0,0	1,00000	1,0000	1,0000
0,1	0,85500	0,9435	1,0000
0,2	0,69230	0,8575	0,9589
0,3	0,51870	0,7708	0,9256
0,4	0,37490	0,6778	0,8926
0,5	0,27680	0,5781	0,8594
0,6	0,19170	0,4667	0,7861
0,7	0,07833	0,3385	0,6606
0,8	0,00000	0,2000	0,4917
0,9	0,00000	0,0375	0,3402
1,0	0,00000	0,0000	0,0000

15

Área bajo la curva: 0,5417

IC del 95%: 0,3642-0,7191 (DeLong) (véase la figura 7)

20 4. Sensibilidad y especificidad de miR-27a para diagnosticar casos y controles.

**No se consideró que fuera significativo

25

Coeficientes:

(Ordenada en el origen)	Estimación	Error est.	Valor de z	Pr(> z)
	0,3299	0,7294	0,452	0,651

ES 2 734 803 T3

miR.27a	0,4782	0,4174	1,146	0,252
sp	se.baja	se.mediana	se.alta	
0,0	1,00000	1,0000	1,0000	
0,1	0,77780	0,9093	1,0000	
0,2	0,70350	0,8889	1,0000	
0,3	0,60370	0,8593	1,0000	
0,4	0,40740	0,8148	0,9630	
0,5	0,25930	0,7407	0,9630	
0,6	0,14810	0,6519	0,9259	
0,7	0,11110	0,4204	0,8704	
0,8	0,07407	0,2593	0,8148	
0,9	0,05370	0,1852	0,5640	
1,0	0,03704	0,1852	0,5556	
se	sp.baja	sp.mediana	sp.alta	
0,0	1,0000	1,0000	1,0000	
0,1	0,7667	1,0000	1,0000	
0,2	0,5556	0,8889	1,0000	
0,3	0,4444	0,7778	1,0000	
0,4	0,3333	0,7778	1,0000	
0,5	0,3333	0,6667	1,0000	
0,6	0,2889	0,6667	0,8889	
0,7	0,1926	0,5556	0,8889	
0,8	0,0000	0,4444	0,7926	
0,9	0,0000	0,1306	0,6667	
1,0	0,0000	0,0000	0,3333	

Área bajo la curva: 0,6358

5

IC del 95%: 0,4132-0,8584 (DeLong) (véase la figura 8).

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano que comprende las etapas de: medir un nivel o patrón de expresión de al menos hsa-miR-223-5p en una o más muestras biológicas aisladas a partir del sujeto; y comparar el patrón de expresión de dicho microARN a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS) con el patrón de expresión de dicho microARN a partir de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS), y en el que un cambio en la expresión de hsa-miR-223-5p es indicativo de escoliosis idiopática del adolescente (AIS).
2. Método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática del adolescente (AIS) en un sujeto humano que comprende las etapas de: medir un nivel o patrón de expresión de al menos los microARN seleccionados de la lista que comprende cualquiera de las siguientes combinaciones de miARN en una o más muestras biológicas aisladas a partir del sujeto:
- a. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-1306-3p;
 - b. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-4523;
 - c. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1306-3p;
 - d. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-1306-3p;
 - e. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-142-5p;
 - f. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-1226-5p;
 - g. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-1226-5p;
 - h. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-4523 y hsa-miR-1306-3p;
 - i. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-4523;
 - j. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-320b;
 - k. hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p;
 - l. hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523; y
 - m. hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523;
- y comparar el patrón de expresión de cualquiera de las combinaciones anteriores de microARN a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto que se sospecha que padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS), con el patrón de expresión de dicha combinación de microARN a partir de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS), y en el que un cambio en la expresión de dicha combinación, es indicativo de escoliosis idiopática del adolescente (AIS).
3. Método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática del adolescente (AIS) según la reivindicación 2, en el que la combinación particular de miARN es hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p.
4. Método para diagnosticar o detectar escoliosis idiopática del adolescente (AIS) según la reivindicación 3, en el que la sobreexpresión o sobrerrepresentación de la combinación de hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p es indicativa de escoliosis idiopática del adolescente (AIS).
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el método comprende además el análisis de al menos hsa-miR-671-5p, en comparación con la expresión a partir del sujeto normal.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la una o más muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra tisular, o una muestra fecal, preferiblemente una muestra de plasma, suero o sangre.
7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nivel de expresión global de

- microARN se mide mediante la determinación del perfil de expresión por micromatriz, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR de punto final, PCR de punto final en múltiplex, PCR en frío, PCR digital en gotas (ddPCR), PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* en múltiplex, o secuenciación de ácido nucleico, en particular secuenciación de ARN pequeño.
- 5
8. Método para predecir (pronosticar) la evolución clínica de la escoliosis idiopática del adolescente (AIS), en un sujeto humano que comprende las etapas de: medir un nivel o patrón de expresión de al menos la combinación de los micro-ARN: hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p en una o más muestras biológicas aisladas a partir del sujeto; y comparar el patrón de expresión de la combinación de microARN a partir de la una o más muestras biológicas del sujeto que padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS), con el patrón de expresión de dicha combinación de microARN a partir de una muestra biológica de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS), y en el que un cambio en la expresión de la combinación de has-miR-1306-3p, has-miR-223-5p, has-miR-27a-5p y has-miR-122-5p es indicativo de una mala evolución clínica, en el que mala evolución clínica se entiende como la progresión de la enfermedad desde deformidades leves (ángulo de Cobb de entre 10 y 25) hasta curvas moderadas (ángulo de Cobb de entre 25° y 35°) en las que los pacientes requieren dispositivo ortopédico, y evolución clínica a curvas intensas (ángulo de Cobb de >45°) dando por tanto como resultado la corrección quirúrgica de la columna vertebral de los pacientes.
- 10
- 15
- 20
9. Método según la reivindicación 8, en el que el método comprende además el análisis de al menos uno de hsa-miR-671-5p, en comparación con la expresión a partir del sujeto normal.
- 25
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en el que la una o más muestras biológicas se seleccionan del grupo que consiste en una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra tisular, o una muestra fecal, preferiblemente una muestra de plasma, suero o sangre.
- 30
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el nivel de expresión global de los microARN se mide mediante determinación del perfil de expresión por micromatriz, PCR, PCR de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real de transcriptasa inversa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR de punto final, PCR de punto final en múltiplex, PCR en frío, PCR digital en gotas (ddPCR), PCR helada, espectrometría de masas, hibridación *in situ* (ISH), hibridación *in situ* en múltiplex, o secuenciación de ácido nucleico, en particular secuenciación de ARN pequeño.
- 35
12. Uso *in vitro* de un kit que comprende: cebadores de PCR para determinar cuantitativamente la cantidad o el nivel de expresión de al menos hsa-miR-223-5p en una muestra biológica aislada tomada a partir de un sujeto humano, para el diagnóstico de escoliosis idiopática del adolescente (AIS) de dicho sujeto humano.
- 40
13. Uso del kit según la reivindicación 12, en el que dicho kit comprende cebadores de PCR para determinar cuantitativamente la cantidad o el nivel de expresión de cualquiera de las siguientes combinaciones de biomarcadores:
- 45
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-1306-3p;
 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-4523;
 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a.5p y hsa-miR-1306-3p;
- 50
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-142,5p y hsa-miR-1306-3p;
 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-142-5p;
 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a.5p y hsa-miR-1226-5p;
- 55
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-320b y hsa-miR-1226-5p;
 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-4523 y hsa-miR-1306-3p;
- 60
- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1226-5p y hsa-miR-4523;
 - hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hs-miR-320b; o
 - hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p y hsa-miR-122-5p;
- 65
- hsa-miR-1306-3p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p,

hsa-miR- 142-5p y hsa-miR-4523; y

- hsa-miR-223-5p, hsa-miR-27a-5p, hsa-miR-320b, hsa-miR-1226-5p, hsa-miR-142-5p y hsa-miR-4523.

- 5 14. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, que comprende además:
- 10 a. instrucciones de uso en el diagnóstico del riesgo de escoliosis idiopática del adolescente (AIS), en el que las instrucciones comprenden indicaciones paso a paso para comparar el nivel de expresión de los microARN, cuando se mide la expresión de una muestra obtenida a partir de un sujeto que se sospecha que tiene escoliosis idiopática del adolescente (AIS), con el nivel de expresión de una muestra obtenida a partir de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece escoliosis idiopática del adolescente (AIS);
- 15 b. herramientas, recipientes y reactivos necesarios para obtener muestras a partir de un sujeto seleccionadas del grupo que consiste en uno o más líquidos biológicos, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de sangre, una muestra tisular, o una muestra fecal, preferiblemente en una muestra de plasma.
- 20 15. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que el kit está en forma de un chip de micromatriz, una tarjeta de microfluidos de q-PCR, un tubo individual de q-PCR, cubas de q-PCR en una tira o una placa de q-PCR (en formato de 96 ó 384 pocillos).

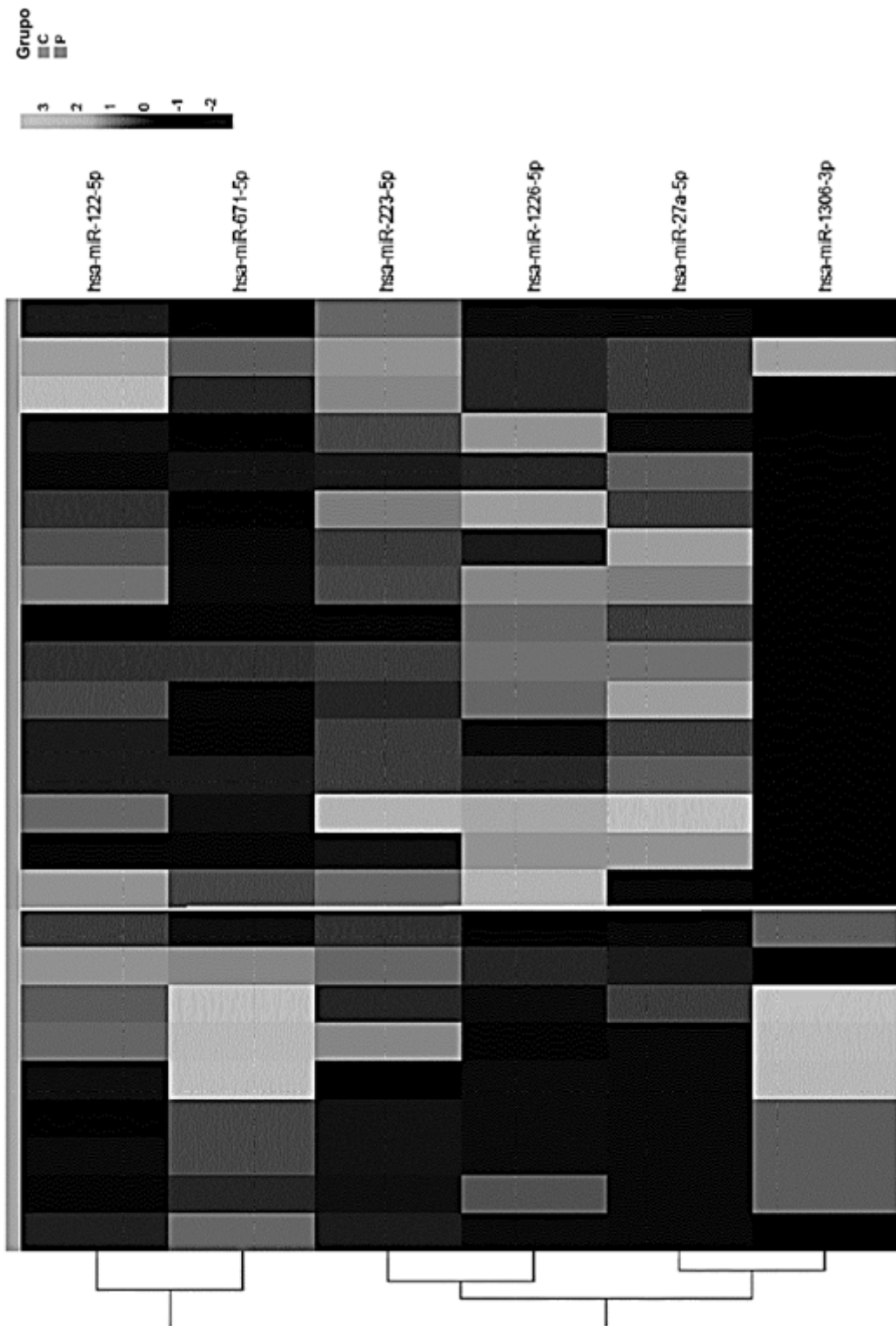
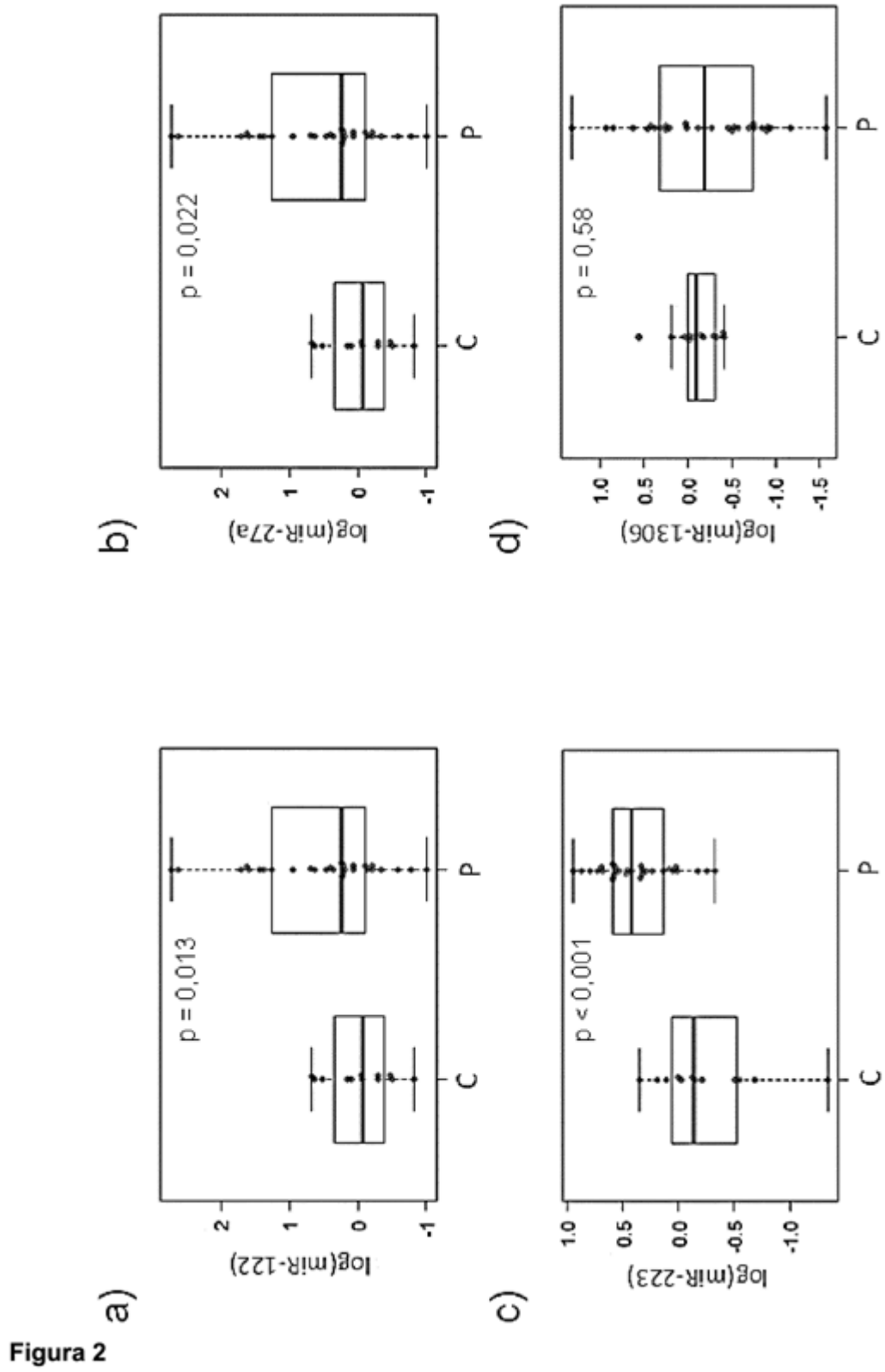


Figura 1



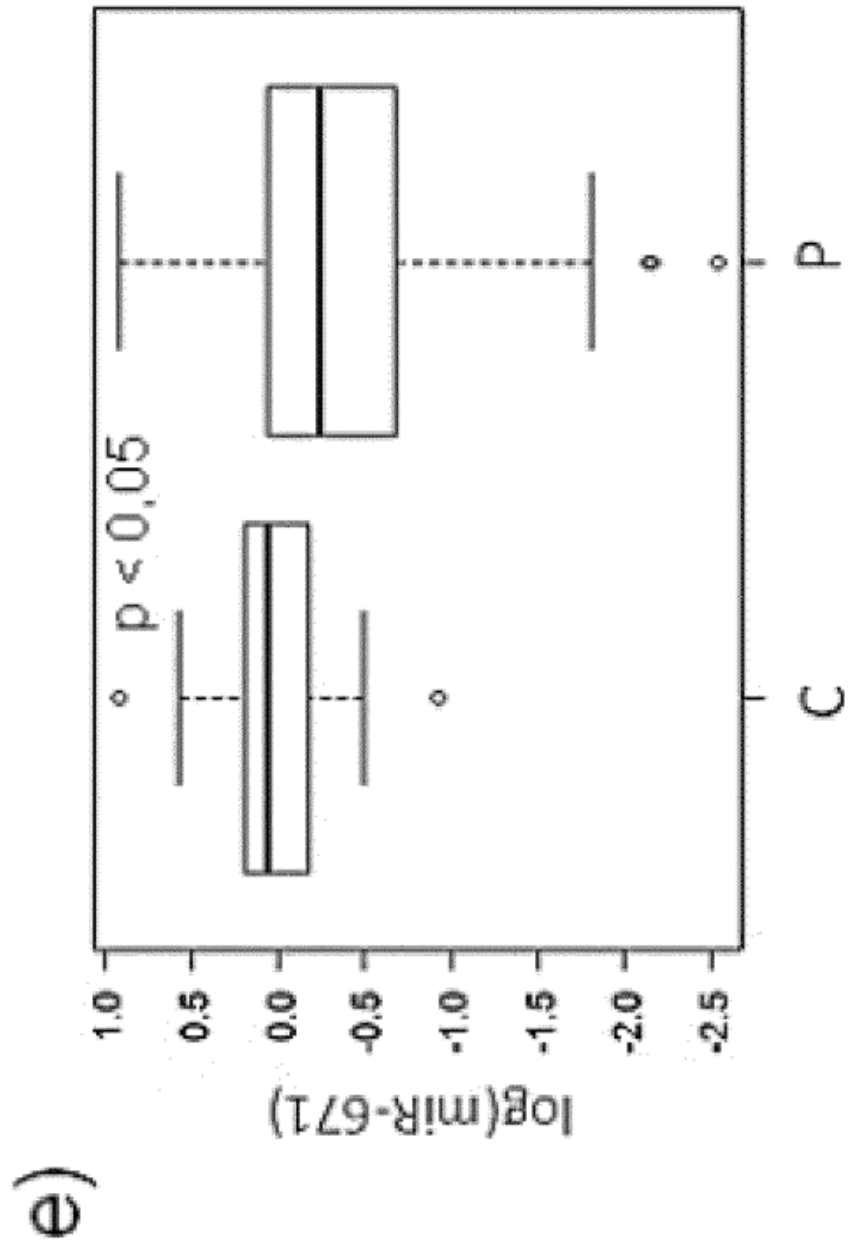


Figura 2, cont.

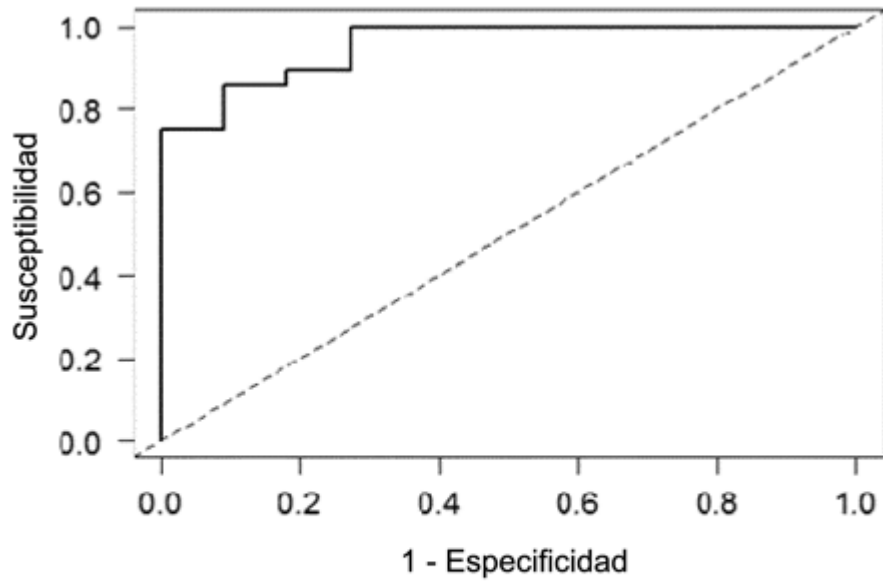


Figura 3

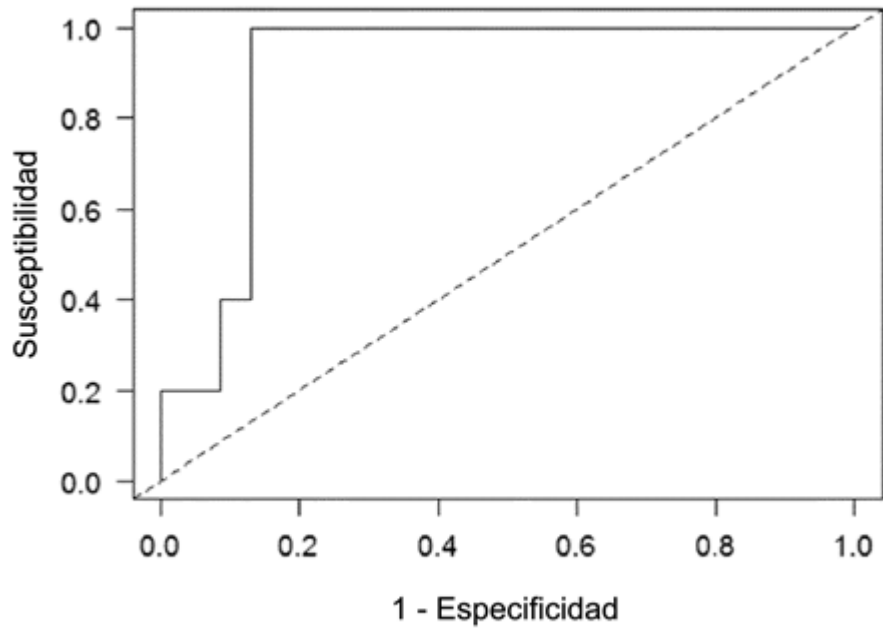


Figura 4

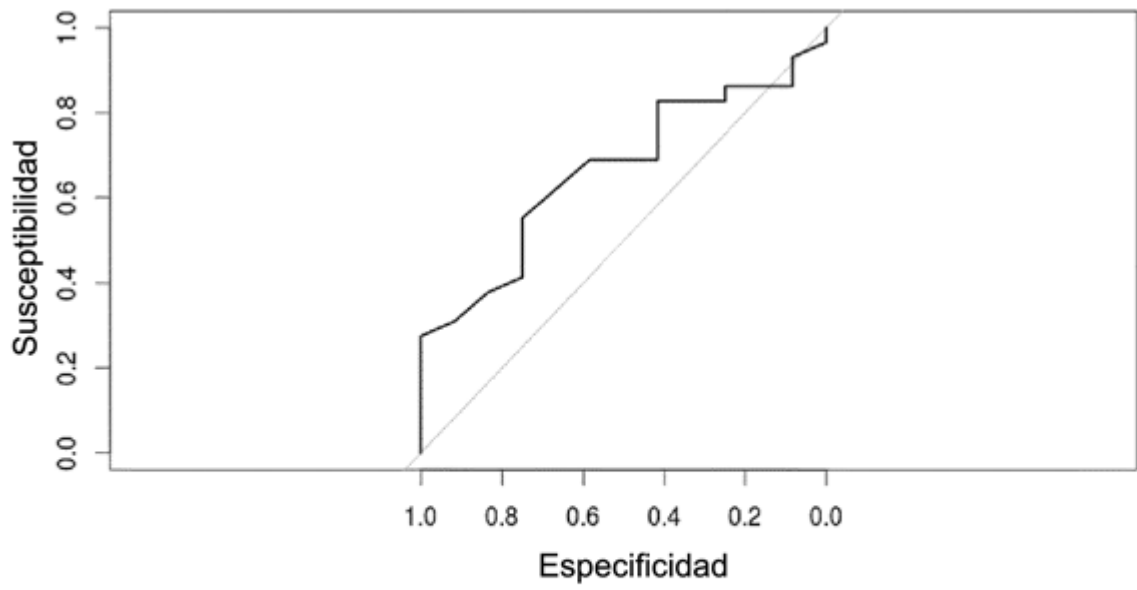


Figura 5

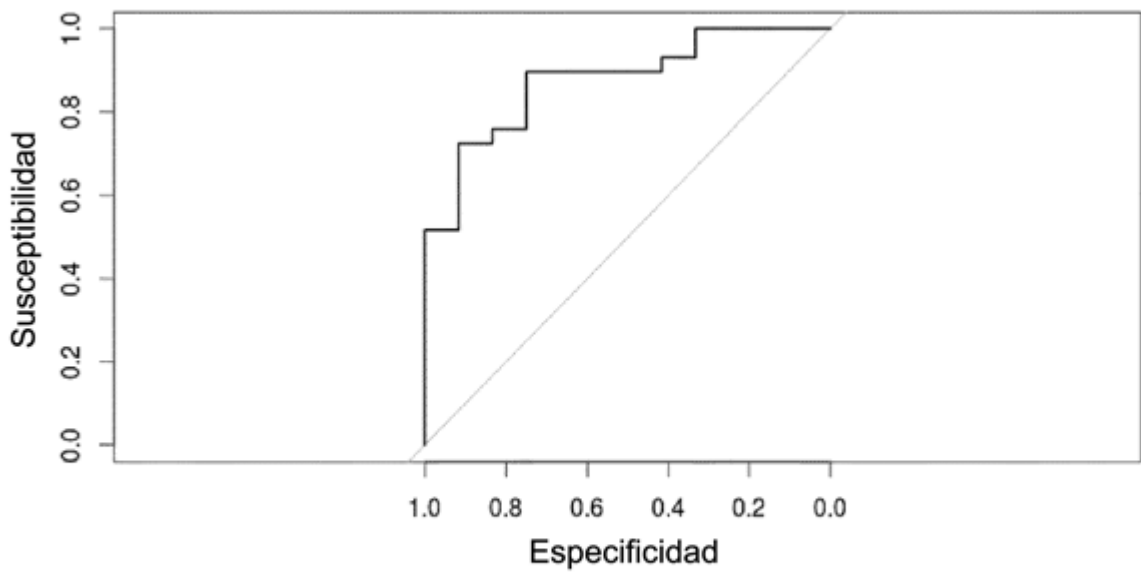


Figura 6

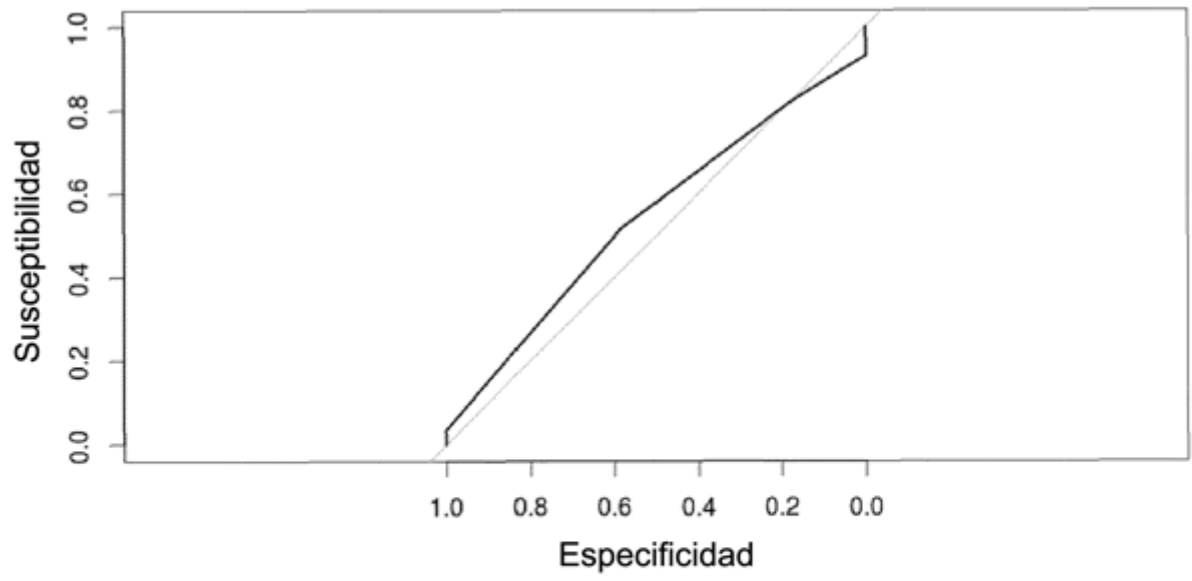


Figura 7

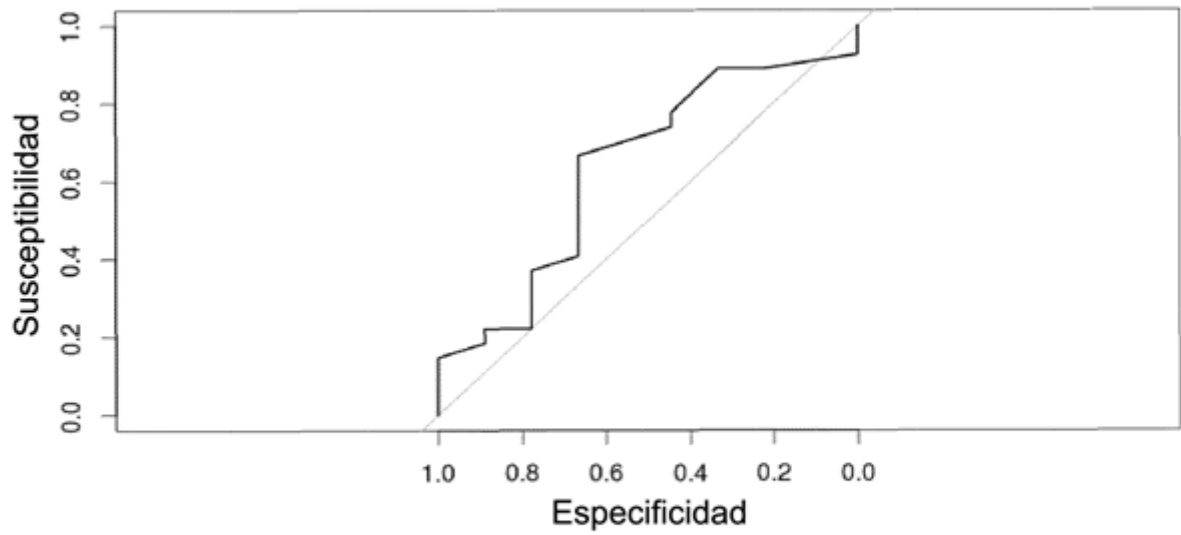


Figura 8