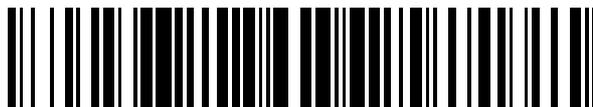


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 604**

21 Número de solicitud: 201130778

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.05.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.12.2012

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:

12.12.2012

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO (100.0%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 LEIOA, Bizkaia, ES**

72 Inventor/es:

**CANCIO URIARTE, Iban;
DIAZ DE CERIO ARRUABARRENA, Oihane;
ROJO BARTOLOMÉ, Iratxe;
BILBAO CASTELLANOS, Eider;
IZAGUIRRE ARAMAYONA, Urtzi;
ORBEA DEL REY, Amaia;
SOTO LOPEZ, Manuel;
MARIGÓMEZ ALLENDE, Juan Antonio;
CAJARAVILLE BEREZIARTUA, Miren Pilare y
ORTIZ ZARRAGOITIA, Maren**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN PECES**

57 Resumen:

Método para la identificación del sexo en peces. La presente invención se relaciona con el uso del ARN ribosómico 5S (ARNr 5S), del ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) o del ARN ribosómico 28S (ARNr 28S), como marcador para identificar el sexo en peces. Asimismo, la invención también se relaciona con un método para clasificar por sexos una población de peces que comprende la determinación del nivel de expresión del ARNr 5S.

ES 2 392 604 A1

DESCRIPCION

MÉTODO PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN PECES

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un método para la determinación del sexo en
5 peces mediante la detección de la expresión del ARN ribosómico 5S, 18S o 28S en las
gónadas de dicho pez,. La presente invención tiene su aplicación en el campo de la
piscicultura (en el manejo y optimización de la cría de peces), en el de las pesquerías (el
estudio de las dinámicas de peces comerciales en provisión) y en el de la toxicología
ambiental (estudio de los efectos biológicos de xenobióticos ambientales).

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La estimación del estadio de madurez reproductiva, así como la determinación de la
proporción de sexos de las poblaciones de peces en aguas europeas, es un requisito de la
DCF (Data Collection Framework) de la Unión Europea como parte de la política para
15 mejorar la gestión de las pesquerías. Para ello, es crucial identificar el sexo de los
animales incluidos en estudios de mortalidad, crecimiento y de patrones de migración
de las provisiones piscícolas, ya que puede haber diferencias importantes asociadas al
sexo en estos parámetros. Estas diferencias así mismo, pueden ser decisivas en la
determinación del éxito reproductor de dichas provisiones. Hoy en día, determinar la
20 madurez reproductiva y el sexo en especies de peces comerciales es muy laborioso y
frecuentemente surge la necesidad de analizar gónadas de un gran número de individuos
mediante análisis visual o histológico en el laboratorio. Pero las campañas
oceanográficas no siempre coinciden con la época reproductiva y esto dificulta (o
imposibilita) la estimación del sexo. Un estudio más preciso de la estructura poblacional
25 (proporción sexual y madurez) de peces comerciales mejoraría significativamente los
modelos de evaluación de estas provisiones.

Por otro lado, los estudios de salud ambiental y biomonitorización de la polución se
centran últimamente en descifrar los mecanismos de acción de los compuestos químicos
liberados al medio. Las bases moleculares de estos mecanismos vienen siendo
30 estudiados en especies centinela de la contaminación vía tecnologías denominadas
“omic”-as (principalmente transcriptómica). La alta sensibilidad de estas introduce

mucho ruido de fondo cuando se estudian machos y hembras por lo que los estudios en especies centinela se centran en organismos juveniles o de un sexo en particular pudiendo perder así mucha información. Por ello, existe la necesidad de revelar el sexo del organismo centinela objeto de estudio. Con ello, se lograría reducir el ruido presente

5 en los perfiles de respuesta de muchos biomarcadores de exposición a xenobióticos. Por otra parte, algunos xenobióticos y factores abióticos, como por ejemplo la temperatura, la disponibilidad de oxígeno o el pH (todos ellos importantes actores en el proceso de cambio climático global), pueden llegar a producir cambios relevantes en la determinación y diferenciación sexual de los organismos acuáticos. Por Ejemplo,

10 recientemente, en la Reserva de la Biosfera de Urdaibai (Gernika) se ha descrito un porcentaje relativamente alto de machos de peces de la especie *Chelon labrosus* (muble) que muestran oocitos entre sus folículos espermáticos. Este fenómeno es denominado intersex y está asociado en el caso de los mubles de Gernika a la alta biodisponibilidad de alquifenoles.

15 El mayor problema del cultivo de peces en estanques es la distinta velocidad de crecimiento de los peces machos y hembras. Para prevenir este problema, los estanques deben sembrarse únicamente con ejemplares de un único sexo, en lo que se denomina cultivo monosexo. Esta técnica se utiliza, por ejemplo, cuando se necesita producir peces grandes para el mercado y los machos se escogen porque crecen casi el doble que

20 las hembras. El resultado del cultivo monosexo es una mejor fuente de proteína y una mayor ganancia para el piscicultor.

Así, uno de los mayores problemas a los que se enfrentan las piscifactorías es el control poblacional de los peces, para lo cual es necesario separar los peces por sexos, optimizando el rendimiento del cultivo de peces.

25 La determinación del sexo en peces puede llevarse a cabo de diferentes maneras, por ejemplo, mediante el sexado a mano, en donde el sexo del pez se puede distinguir visualmente inspeccionando la papila genital en la parte ventral del pez, observando los opérculos (lo que tapa a las branquias) o el orificio cloacal, el tamaño de las aletas dorsales, la coloración de las escamas, etc. El parámetro a elegir en el sexado dependerá

30 de las características fenotípicas del pez en cuestión. Los piscicultores con experiencia pueden separar manualmente (sexar) cerca de 2000 peces al día, pero este método no es 100% efectivo.

Otros métodos de sexado incluyen el empleo de dispositivos capaces de medir simultáneamente varias características morfológicas que diferencian machos de hembras, o el empleo de marcadores moleculares que se expresan diferencialmente dependiendo del sexo del individuo.

- 5 La solicitud de patente US2008210766 describe un dispositivo para determinar el género de un pez mediante la medida de sus características morfológicas, como son la longitud del cuerpo, la longitud de la cabeza, la longitud del cuerpo, etc.

La solicitud de patente WO2009063101 describe un método para determinar el sexo de los peces basado en la diferencia de color entre las gónadas de los machos y las hembras, que consiste en la inserción de una sonda en las gónadas del pez y analizar el espectro de luz obtenido tras una radiación electromagnética sobre la gónada.

10

En la misma línea, la solicitud de patente US3859522 describe un método y un aparato para determinar el sexo de un pez basado en la distinta manera de dispersar la luz de las huevas presentes en el pez hembra y del esperma presente en el pez macho.

- 15 La solicitud de patente CN101429557 describe un método para determinar el sexo de los peces de la familia *Pleuronectidae*, que comprende extraer ADN de la aleta e identificar mediante AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) marcadores moleculares específicos de las hembras que presentan un peso molecular de 533 pb y 218 pb.

20 La solicitud de patente CN101240348 describe un método para el sexado genético de peces que comprende la extracción del ADN, el diseño y síntesis de cebadores específico de LAMP, y la detección de los productos de amplificación de LAMP para determinar el sexo del individuo, siendo la detección de los productos de amplificación indicativos de que el pez pertenece al sexo femenino.

25 Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar métodos alternativos a los existentes en el estado de la técnica, que permitan la identificación del sexo en los peces para el establecimiento de cultivos monosexo.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han descubierto que una simple electroforesis del ARN total obtenido a partir de una muestra biológica de las gónadas de un pez, presenta una distribución de bandas capaz de diferenciar individuos según el sexo. La aparición de una banda con un tamaño aproximado de 120 nucleótidos, que tras su
 5 secuenciación se vio que correspondía al ARN ribosómico 5S (ARNr 5S), permite concluir que el pez es de sexo femenino (hembra). Por otro lado, la aparición de una banda correspondiente al ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) y/o al ARN ribosómico 18S (ARNr 28S), permite concluir que el pez es de sexo masculino (macho) (Ver Ejemplo 1 y Figuras 1, 3 y 4). Por lo tanto, según la presente invención, es posible
 10 emplear el ARN ribosómico presente en las gónadas de un pez como marcador para identificar el sexo de este.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso del ARNr 5S, del ARNr 18S o del ARNr 28S como marcador para identificar el sexo de los peces.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar el sexo de un
 15 pez que comprende detectar la expresión del ARNr 5S, del ARNr 18S y del ARNr 28S en una muestra biológica de las gónadas de dicho pez, en donde

- si la expresión del ARNr 5S detectada es mayor que la expresión del ARNr 18S o del ARNr 28S detectada, entonces el pez es de sexo femenino, o
- si la expresión del ARNr 18S o del ARNr 28S detectada es mayor que la
 20 expresión del ARNr 5S detectada, entonces el pez es de sexo masculino.

Adicionalmente, los inventores también han descubierto que el nivel de expresión de dicho ARNr 5S es diferente en machos y hembras, pudiendo emplear el nivel de expresión del ARNr 5S como un nuevo marcador molecular para identificar el sexo de los peces. En concreto, los inventores han observado, tal como se muestra en el Ejemplo
 25 1 de la presente memoria, que el nivel de expresión del ARNr 5S en las gónadas de peces macho de muble (incluidos macho intersex) es menor que en las gónadas de peces hembra, pudiendo desarrollar así un método para el sexado de peces basado en la cuantificación de ARNr 5S gonadal, puesto que dicho ARNr 5S está altamente conservado en todas las especies de peces. Por otro lado, tal como se muestra en los
 30 Ejemplos 2 y 3, los inventores también observaron que los niveles de expresión de tanto las moléculas asociadas al ARNr 5S, como las moléculas implicadas en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, son similares a los niveles de expresión del ARNr 5S, es decir, están más

expresados en hembras que en machos, por lo que también pueden emplearse como marcador en el sexado de peces.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, como marcador para identificar el sexo de los peces.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para clasificar por sexos una población de peces, en donde dicho método comprende

- (i) determinar el nivel de expresión del ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, en las gónadas procedentes de dicha población de peces, y
- (ii) observar el patrón de distribución de los niveles de expresión obtenidos, en donde si aparecen dos poblaciones muestrales significativamente distintas entre sí, entonces los individuos (peces) que forman parte de la población muestral que presenta el mayor nivel de expresión son hembras, y los individuos que forman parte de la población muestral que presenta el menor nivel de expresión son machos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el resultado de la electroforesis (RNA chip, Agilent 2100 Bionalyzer) de ARN total extraído de la gónada de mubles hembras (F, muestras 1 a 5) y machos (M, muestras 6 a 10), capturados en julio 2010 en el puerto de Pasaia (Guipúzcoa). La banda más potente que aparece en las muestras de hembra pertenece al ARNr 5S, mientras que las 2 bandas más fuertes de machos pertenecen al ARNr 18S y ARNr 28S. Perfil de fluorescencia del gel indica lo mismo.

La Figura 2 muestra el resultado de la cuantificación de los niveles de transcripción de ARNr 5S. Rosa=hembra (F), azul = macho (M), amarillo = intersex (I). Los niveles de transcripción de 5S rRNA son mucho mayores en las hembras capturadas en los estuarios de Bilbao (B), Pasaia (P), Plentzia (PL) y Urdaibai (U) que en los machos. En el puerto de Pasaia estas diferencias son demostrables en todos los meses estudiados.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre medianas. Pasaia en Julio es donde encontramos menos diferencia entre hembras y machos. Así y todo, la diferencia es de 6-7 ciclos de amplificación.

La Figura 3 muestra el resultado de la electroforesis (RNA chip, Agilent 2100 Bionalyzer) de ARN total extraído de la gónada de pez cebra hembras (muestras 1 a 5) y machos (muestras 1 a 10). La banda más potente que aparece en las muestras de hembra pertenece al ARNr 5S, mientras que las 2 bandas más fuertes de machos pertenecen al ARNr 18S y 28S. Perfil de fluorescencia del gel indica lo mismo.

La Figura 4 muestra el resultado de la electroforesis (RNA chip, Agilent 2100 Bionalyzer) de ARN total extraído de la gónada de merluza hembras (H, muestras 1 a 7, en color rosa) y machos (M, muestras 8 a 10, en color azul), obtenidos en la lonja de pescadores de Bermeo (Bizkaia) en el mes en Marzo 2011. La banda más potente que aparece en las muestras de hembra pertenece al ARNr 5S, mientras que las 2 bandas más fuertes de machos pertenecen al ARNr 18 y 28S. Perfil de fluorescencia del gel indica lo mismo.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la ruta de regulación transcripcional, acumulación y empaquetamiento del ARNr 5S.

La Figura 6 muestra el resultado de la cuantificación de los niveles de transcripción de las proteínas relacionadas con el factor de transcripción III (TFIII α) y la proteína 42sp43. Rosa=hembra (F), azul = macho (M), amarillo = intersex (I). Los niveles de transcripción de ARNr 5S son mucho mayores en las hembras capturadas en los estuarios de Bilbao (B), Pasaia (P), Plentzia (PL) y Urdaibai (U) que en los machos. En el puerto de Pasaia estas diferencias son demostrables en todos los meses estudiados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre medianas. Pasaia en Julio es donde encontramos menos diferencia entre hembras y machos.

La Figura 7 muestra los niveles de expresión de IMP α 1 y 2, pudiendo diferenciar hembras y machos en los 4 estuarios estudiados, y en todos los meses estudiados en el puerto de Pasaia. Diferencias relativas de expresión entre sexos son similares a los mostrados por ARNr 5S, TFIIIA y 42sp43. Asimismo, sirven como marcadores de machos intersex (asteriscos muestran oocitos dentro de folículos espermáticos de un

muble macho capturado en Noviembre). IMP β 2 en cambio no muestra transcripción diferencial entre ambos sexos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Los inventores de la presente invención han descubierto que una simple electroforesis del ARN total obtenido a partir de una muestra biológica de las gónadas de un pez, presenta una distribución de bandas capaz de diferenciar individuos según el sexo. La aparición de una banda con un tamaño aproximado de 120 nucleótidos, que tras su secuenciación se vio que correspondía al ARN ribosómico 5S (ARNr 5S), permite
10 concluir que el pez es sexo femenino (hembra). Por otro lado, la aparición de una banda correspondiente al ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) y/o al ARN ribosómico 28S (ARNr 28S), permite concluir que el pez es de sexo masculino (macho) (Ver Ejemplo 1 y Figuras 1, 3 y 4). Por lo tanto, según la presente invención, es posible emplear el ARN ribosómico presente en las gónadas de un pez como marcador para identificar el sexo de
15 este.

Así, en un aspecto, la invención se relaciona con el uso del ARNr 5S, del ARNr 18S o del ARNr 28S, como marcadores para identificar el sexo de los peces.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar el sexo de un pez que comprende detectar la expresión del ARNr 5S en una muestra biológica de las
20 gónadas de dicho pez, en donde si dicha banda es detectada, entonces el pez es de sexo femenino.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para determinar el sexo de un pez, de aquí en adelante, primer método de la invención, que comprende detectar la expresión del ARNr 5S, del ARNr 18S y del ARNr 28S en una muestra biológica de las
25 gónadas de dicho pez, en donde

- si la expresión del ARNr 5S detectada es mayor que la expresión del ARNr 18S o del ARNr 28S detectada, entonces el pez es de sexo femenino, o
- si la expresión del ARNr 18S o del ARNr 28S detectada es mayor que la expresión del ARNr 5S detectada, entonces el pez es de sexo masculino.

En la presente invención, el término “pez” se refiere a cualquier animal dentro de una superclase de animales vertebrados acuáticos *gnatostomados* (quiere decir provistos de mandíbulas articuladas), dotados de aletas pares y que respiran por branquias. Los peces son mayoritariamente marinos (incluyen, pero no se limitan a, la sardina, el boquerón, el arenque, el atún, la caballa, la barracuda, el rodaballo, el lenguado, etc.), aunque existen 5 variadas especies de agua dulce (incluyen, pero no se limitan a, la trucha, el esturión, la carpa, el barbo, el lucio, etc.), y variedades cuyo ciclo reproductivo transcurre entre el mar y los ríos (incluyen, pero no se limitan, los salmones y las anguilas). A su vez, los peces se dividen en *Condriictios* (de esqueleto cartilaginoso), y *Osteictios* (de esqueleto 10 óseo).

En una realización particular, el pez se selecciona del grupo que consiste en el muble (*Chelon labrosus*), el pez cebra (*Danio rerio*) y la merluza (*Merluccius merluccius*).

La puesta en práctica del método de la invención requiere la extracción del ARN total de una muestra biológica procedente de las gónadas del pez, lo cual puede hacerse por 15 cualquiera de los métodos disponibles en el estado de la técnica para la extracción de ácidos nucleicos (Sambrook *et al.*, 2001. “Molecular cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3).

Para este propósito, la muestra biológica procedente de las gónadas del pez se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula para 20 liberar los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para análisis adicionales. Posteriormente, los ácidos nucleicos se extraen de la muestra mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente. Como sabe el experto en la materia, se tiene cuidado para evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

25 Una vez extraído y aislado el ARN total de la muestra procedente de las gónadas del pez, es decir, de los órganos reproductores del pez, se procede a detectar la expresión del ARNr 5S, del ARNr 18S y del ARNr 28S por cualquiera de los procedimientos que existen en el estado de la técnica, como por ejemplo, mediante electroforesis o un chip de ARN.

30 La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada

de un soporte sólido (por ejemplo, electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa. La variante de uso más común para el análisis de ácidos nucleicos utiliza como soporte un gel, habitualmente de agarosa o de poliacrilamida. La preparación y realización de electroforesis para la separación de ácidos nucleicos es práctica de rutina para el experto en la materia, e información sobre la misma puede encontrarse en Sambrook *et al.*, 2001 (citado *ad supra*). Una vez realizada la electroforesis se procede a la detección de las bandas en el soporte mediante técnicas de tinción y, si se visualizan las bandas correspondientes al ARNr 5S, al ARNr 18S y al ARNr 28S, se puede entonces concluir que

- si la expresión del ARNr 5S detectada es mayor que la expresión del ARNr 18S o del ARNr 28S detectada, entonces el pez es de sexo femenino, o
- si la expresión del ARNr 18S o del ARNr 28S detectada es mayor que la expresión del ARNr 5S detectada, entonces el pez es de sexo masculino.

En la presente invención se entiende por “ARN ribosómico 5S” o “ARNr 5S” a la molécula de ARN que forma parte de la subunidad mayor del ribosoma eucariota, junto con el ARNr 28S, el ARNr 5.8S y 49 proteínas. Dicho ARNr 5S presenta un tamaño de, aproximadamente, 120 nucleótidos.

En la presente invención se entiende por “ARN ribosómico 18S” o “ARNr 18S” a la molécula de ARN que forma parte de la subunidad menor del ribosoma eucariota, junto con 33 proteínas.

En la presente invención se entiende por “ARN ribosómico 28S” o “ARNr 28S” a la molécula de ARN que forma parte de la subunidad mayor del ribosoma eucariota, junto con el ARNr 5S, el ARNr 5.8S y 49 proteínas.

Adicionalmente, los inventores también han descubierto que el nivel de expresión de dicho ARNr 5S es diferente en machos y hembras. En concreto, los inventores han observado, tal como se muestra en el Ejemplo 1 de la presente memoria, que el nivel de expresión del ARNr 5S en las gónadas de peces macho de muble (incluidos macho intersex) es menor que en las gónadas de peces hembra, pudiendo desarrollar así un método para el sexado de peces basado en la cuantificación de ARNr 5S gonadal,

5 puesto que dicho ARNr 5S está altamente conservado en todas las especies de peces. Por otro lado, tal como se muestra en los Ejemplos 2 y 3, los inventores también observaron que los niveles de expresión de tanto las moléculas asociadas al ARNr 5S como las moléculas implicadas en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, son similares a los niveles de expresión del ARNr 5S, es decir, están más expresados en hembras que en machos, por lo que también puede emplearse como marcador molecular en el sexado de peces.

10 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para clasificar por sexos una población de peces, de aquí en adelante, segundo método de la invención, en donde dicho método comprende

- 15 (i) determinar el nivel de expresión del ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, en las gónadas procedentes de dicha población de peces, y
- (ii) observar el patrón de distribución de los niveles de expresión obtenidos, en donde si aparecen dos poblaciones muestrales significativamente distintas entre sí, entonces los individuos que forman parte de la población muestral que presenta el mayor nivel de expresión son hembras, y los individuos que forman parte de la población muestral que presenta el menor nivel de expresión son machos.

25 Los términos “pez” y “ARNr 5S”, así como los métodos de extracción del ARN a partir de una muestra biológica procedente de las gónadas del pez, han sido descritos previamente para el primer método de la invención y su definición es aplicable al segundo método de la invención. En una realización particular, el pez se selecciona del grupo que consiste en el muble, el pez cebra y la merluza.

30 Una vez obtenido el ARN, la puesta en práctica del segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión del ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, en las gónadas del pez.

Los niveles de expresión del ARNr 5S obtenido según se ha mencionado anteriormente pueden ser determinados mediante ensayos de hibridación o de amplificación que incluyen, sin limitación, ensayos de Northern Blot y reacción en cadena de polimerasa (PCR). Preferiblemente, la detección del ARNr se lleva a cabo tras una reacción previa

5 de transcripción inversa del ARNr al ADNc, utilizando la enzima transcriptasa inversa y el ADNc resultante es amplificado usando técnicas de amplificación ampliamente conocidas, tales como la reacción en cadena de la polimerasa clásica (PCR), reacción en cadena de polimerasa en tiempo real ("RT-PCR"), reacción en cadena de ligasa ("LCR"), replicación de secuencias auto-sostenida ("3SR") también conocida como

10 amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos ("NASBA"), amplificación Q-B-Replicasa, amplificación por círculo rodante ("RCA"), amplificación mediada por transcripción ("TMA"), amplificación asistida por enlazadores ("LADA"), amplificación por desplazamiento múltiple ("MDA"), amplificación por desplazamiento de la cadena y del invasor ("SDA"). Otro método para la detección del ARNr 5S incluye

15 el uso de sondas que son capaces de hibridar específicamente con el ARNr. La sonda puede ser un ADNc de cadena completa o un fragmento del mismo como por ejemplo un oligonucleotido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud capaz de hibridar con al ARNr o ADNc diana en condiciones de estrictas. En una realización preferida de la invención, el ARNr es sometido a una reacción de

20 transcripción inversa y el ADNc resultante se amplifica mediante una reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.

En la presente invención, se entiende por "molécula asociada al ARNr 5S" a aquellas moléculas o proteínas que se unen al ARNr 5S y que, por ejemplo, ayudan a su almacenamiento en el citosol hasta que el ARNr es requerido para formar los ribosomas

25 (ver Figura 5). En una realización particular, la molécula asociada al ARN 5S es el factor de transcripción general IIIA (TFIIIA) o la proteína 42sp43.

En la presente invención, se entiende por "molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S" a aquellas moléculas o proteínas que transportan desde el citosol al núcleo

30 celular (o viceversa) proteínas necesarias para la transcripción, como por ejemplo, los factores de transcripción. Ejemplos de moléculas implicadas en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción incluyen, sin limitar a, las

importinas y las exportinas. En una realización particular, molécula implicada en el transporte de proteínas que interviene en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, es la proteína importina α -1 o la proteína importina α -2.

Como entiende el experto en la materia, los niveles de expresión tienen que ser normalizados. Para normalizar los valores de expresión entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de expresión de la molécula de interés (el ARNr 5S, una molécula asociada al ARNr 5S, o una molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S) en las muestras a ensayar con la expresión de un ARN control. Un “ARN control” como se usa, se refiere a un ARN cuyos niveles de expresión no cambian o solo cambian en cantidades limitadas. Preferiblemente, los ARN control son ARN derivados de genes de mantenimiento y que codifican proteínas que se expresan de forma constitutiva y que llevan a cabo funciones celulares esenciales. Ejemplos de genes de mantenimiento incluyen, pero no se limitan a, β -2-microglobulina, ubiquitina, ciclofilina, GAPDH y actina. En una forma de realización, la cuantificación de la expresión génica relativa se calcula según el método comparativo Ct usando β -actina como control endógeno y controles de ARN comerciales como calibradores. Los resultados finales se determinan según la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ de la muestra - ΔCt del calibrador), donde los valores ΔCt del calibrador y de la muestra se determinan sustrayendo el valor Ct del gen diana del valor del gen de la β -actina.

Una vez calculado el nivel de expresión, el segundo método de la invención comprende observar el patrón de distribución de los niveles de expresión obtenidos y, en función de dicho patrón de distribución, concluir el sexo de los peces analizados.

En la presente invención, se entiende por “patrón de distribución” a la posición que presentan un conjunto de valores en función de un parámetro. En el contexto de la presente invención, el patrón de distribución hace referencia a la posición de cada uno de los niveles de expresión obtenidos en función de la concentración de la molécula que se está midiendo, por ejemplo, en función de la concentración de ARNr 5S. Una vez obtenido el patrón de distribución de los niveles de expresión, si aparecen dos poblaciones muestrales significativamente distintas entre sí, entonces los individuos que forman parte de la población muestral que presenta el mayor nivel de expresión son

hembras, y los individuos que forman parte de la población muestral que presenta el menor nivel de expresión son machos.

En la presente invención se entiende por “población muestral” al conjunto de valores que presentan un patrón de distribución similar, es decir, al conjunto de niveles de expresión cuya posición en función de la concentración es similar o está cercana uno de otros.

En la presente invención se entiende que dos poblaciones muestrales (p_1 y p_2) son significativamente distintas entre sí, cuando cada población muestral presenta un patrón de distribución cuya mediana (m_1 y m_2) es distinta, y cuando la distancia entre un elemento de una población muestral (por ejemplo, e_1) y la mediana de la otra población muestral (m_2) es mayor que la distancia entre el elemento de la población muestral (e_1) y la mediana de la población muestral a la que pertenece (m_1). En este contexto, la mediana hace referencia al valor de expresión medio de todos los valores de expresión que pertenecen a la misma población muestral. Como entiende el experto en la materia, existen métodos estadísticos que permiten averiguar si dos poblaciones muestrales son significativamente distintas entre sí.

No obstante, es posible que existan valores de expresión que no presenten un patrón de distribución similar a alguna de las poblaciones muestrales y, por lo tanto, dichos valores intermedios no puedan ser clasificados como procedentes de un pez macho o un pez hembra. En este caso, los individuos de la población de peces cuyos niveles de expresión estén significativamente desviados de la media de los niveles de expresión de cada una de las poblaciones muestrales, son machos intersex.

En la presente invención se entiende por “macho intersex” al pez macho que debido a su exposición a xenoestrogénos ambientales muestran oocitos entre sus folículos espermáticos.

Como se ha indicado previamente, en una realización particular del segundo método de la invención, el nivel de expresión se mide preferiblemente mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). Si este es el caso, entonces el nivel de expresión viene determinado por la Ct de la RT-PCR. Por lo tanto, en una realización particular del segundo método de la invención, el valor Ct de la población que presenta el menor nivel de expresión medio es igual o mayor en 2, preferiblemente en 3, más

preferiblemente en 4, todavía más preferentemente en 5 unidades que el valor Ct de la población que presenta el mayor nivel de expresión medio.

De forma análoga al segundo método de la invención, la presente invención también contempla un método para clasificar por sexos una población de peces, en donde dicho

5 método comprende

(i) determinar el nivel de expresión del ARNr 18S y/o del ARNr 28S, en las gónadas procedentes de dicha población de peces, y

(ii) observar el patrón de distribución de los niveles de expresión obtenidos,

10 en donde si aparecen dos poblaciones muestrales significativamente distintas entre sí, entonces los individuos que forman parte de la población muestral que presenta el mayor nivel de expresión son machos, y los individuos que forman parte de la población muestral que presenta el menor nivel de expresión son hembras.

La presente invención se basa en la observación de que el nivel de expresión del ARNr 5S (o de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S) en las gónadas de peces hembra es mayor que en las gónadas de peces machos y por lo tanto, en función de dicho parámetro, es posible diferenciar machos de hembras en una población de peces. Como entiende el experto en la materia, la determinación de los niveles de expresión para averiguar si un pez dado es macho o hembra, también puede realizarse mediante la correlación del nivel de expresión con un valor de referencia, cuya obtención es práctica de rutina para el experto en la materia.

El valor de referencia puede corresponder, por ejemplo, al valor mediana de los niveles de expresión de ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, medidos en las gónadas en una población peces de la misma especie y en el mismo estado fisiológico que el pez cuyo sexo se quiere averiguar. El número de peces que constituye la población que va ser empleada para establecer el valor mediana, está constituido por un número de individuos que sea lo suficientemente alto como para ser estadísticamente representativo. Una vez establecido este valor mediana, se puede comparar el nivel de expresión obtenido en el pez cuyo sexo se quiere averiguar con dicho valor mediana, y

de esta manera ser asignado al nivel de bajo (macho), medio (macho intersex) o alto (hembra). No obstante, debido a la variabilidad entre los ejemplares (ciclo reproductor, sexo, dilución, calidad de la muestra estudiada) resulta muy difícil establecer valores de referencia absolutos para el ARNr 5S, una molécula asociada al ARNr 5S, o una
 5 molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S. Por este motivo, puede ser preferible establecer dos valores de referencia, de aquí en adelante, primer y segundo valor de referencia, en donde

- si el nivel de expresión del ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o una
 10 molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, es menor o igual que un primer valor de referencia, entonces el pez es del sexo femenino,
- si el nivel de expresión del ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o una
 15 molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, es mayor o igual que un segundo valor de referencia, entonces el pez es del sexo masculino; y
- si el nivel de expresión del ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o una
 20 molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, se encuentra entre el primer y segundo valores de referencia, entonces el pez es un macho intersex.

El primer y segundo valor de referencia se obtendrían mediante la cuantificación por RT-PCR del nivel de expresión del ARNr 5S, de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, en las gónadas de una
 25 población de peces de la misma especie y en el mismo estado fisiológico que el pez cuyo sexo se quiere averiguar, y en donde el primer valor de referencia corresponde a la población muestral con el menor número de ciclos, el segundo valor de referencia corresponde a la población muestral con el mayor número de ciclos, y en donde la diferencia entre el primer y segundo valor de referencia es de, al menos, 2, 3, 4, o 5
 30 ciclos.

Por lo tanto, alternativamente al segundo método de la invención, la presente invención también se relaciona con un método para determinar el sexo de un pez que comprende

medir el nivel de expresión ARNr 5S, o de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, en una muestra biológica procedente de las gónadas de dicho pez, en el que

- 5 - si el nivel de expresión de la subunidad menor del ARN ribosómico 5S, o de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, es mayor que un valor de referencia, entonces el pez es del sexo femenino,
- 10 - si el nivel de expresión de la subunidad menor del ARN ribosómico 5S, o de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, es menor que un valor de referencia, entonces el pez es del sexo masculino; y
- 15 - si el nivel de expresión de la subunidad menor del ARN ribosómico 5S, o de una molécula asociada al ARNr 5S, o de una molécula implicada en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARNr 5S, es similar o igual que un valor de referencia, entonces el pez es un macho intersex.

Por otro lado, la invención también se relaciona con un kit que comprende los reactivos necesarios para poner en práctica los métodos de la invención, entre los que se incluyen, pero no se limitan a, tampones, agentes para prevenir la contaminación, sondas, controles positivos y negativos, cebadores, polimerasas, marcadores fluorescentes, marcadores de peso molecular, etc., así como una muestra control que proporciona un valor de referencia a partir de la cual se puede determinar si un pez es macho o es hembra. Por otro lado, el kit también puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para su utilización.

TRADUCCIÓN DEL TEXTO DE LA LISTA DE SECUENCIAS

- 30 - "METHOD FOR IDENTIFYING THE SEX OF FISH" - método para la identificación del sexo en peces
- "*Forward primer for amplifying 5S rRNA*" - Cebador directo para amplificar el ARNr 5S

- “Reverse primer for amplifying 5S rRNA” – Cebador inverso para amplificar el ARNr 5S

Los siguientes ejemplos simplemente ilustran la invención y no pretenden ser limitativos la misma.

5

EJEMPLO 1

Identificación del sexo de un pez mediante la cuantificación de la subunidad pequeña del ARN ribosomal 5S

I.- MATERIAL Y MÉTODOS

10 Ejemplares muestreados

Los análisis se llevaron a cabo sobre mubles (*Chelon labrosus*) machos y hembras sexados histológicamente, procedentes de cuatro estuarios de la costa vasca (Bilbao, Plentzia, Urdaibai y Pasaia). Se estudiaron seis individuos de cada sexo por punto de muestreo.

- 15 Para determinar la expresión diferencial a lo largo del ciclo reproductor, se capturan mubles mensualmente desde julio de 2010 en el puerto de Pasaia. Los animales fueron diseccionados in situ inmediatamente tras su captura, y una porción de gónada de cada individuo fue conservada en nitrógeno líquido embebida en RNAlater® (SIGMA-ALDRICH), y la otra porción fue fijada químicamente para su inclusión en metacrilato.
- 20 Las muestras congeladas se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Los animales fueron sexados histológicamente, y se analizaron los niveles de expresión de ARNr 5S en 6 individuos macho y 6 individuos hembra, y todos los machos intersex encontrados (machos que por exposición a xenoestrógenos ambientales muestran oocitos entre sus folículos espermáticos), en los meses de julio, septiembre, noviembre, diciembre, enero y marzo.

Aislamiento del ARN total

- La extracción de RNA total se realizó utilizando TRIzol® (Invitrogen, Estados Unidos), siguiendo los pasos sugeridos por la casa comercial. Las muestras, alrededor de 50 mg

30

de tejido, fueron homogenizadas tras la separación del RNAlater® en un homogenizador HYBAID RiboLyser FP120-HY-230 utilizando bolas de zirconio/silica durante 45 segundos a máxima velocidad. La concentración y pureza del RNA se evaluaron mediante espectrofotometría (BioPhotometer, Eppendorf, Alemania).

5

Electroforesis

Cargando igual cantidad de ARN total por muestra estudiada en un microchip de ARN de Agilent, se analizó la distribución de bandas en un analizador Agilent 2100 Analyser. Alternativamente, se puede cargar igual cantidad de ARN total en un gel de agarosa al 10 1% y ver la distribución de bandas atizando bromuro de etidio.

Reacción en cadena de la polimerasa

Para sintetizar el ADN complementario se utilizó el kit SuperScript™ First Synthesis System para RT-PCR (Invitrogen), partiendo de 100 ng de ARN total en un 15 termociclador (2720 Thermal Cycler, AppliedBiosystems, Estados Unidos) utilizando hexámeros al azar.

Los cebadores específicos se diseñaron con ayuda del programa Primer Express® 3.0, Software for Real-Time PCR de AppliedBiosystems.

20

Cebadores específicos generados sobre la secuencia obtenida del GenBank, (Fw: Forward; Rv: Reverse) para la amplificación de ARNr 5S.

Gen	Nº acceso GenBank	Secuencia Cebadores	
5S rRNA	AM706461 (SEQ ID NO: 1)	Fw 5´-CTTACGGCCATACCACCCTG-3´	SEQ ID NO: 2
		Rv 5´-GTATCCCAGGCGGTCTCC-3´	SEQ ID NO: 3

25 Se estandarizaron las condiciones óptimas de amplificación del par de cebadores, teniendo en cuenta parámetros como la temperatura, la concentración de cDNA y la concentración de cebadores, realizando las amplificaciones durante 35 ciclos, en un termociclador. Una vez que se demostró que los cebadores diseñados amplifican un solo transcrito del tamaño esperado, se realizaron los ensayos para la optimización de los 30 ensayos de PCR cuantitativa utilizando SYBR Green.

Las reacciones de Q-PCR se realizaron con ADNc a una concentración de 5 ng/μl utilizando el kit FastStar Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Alemania), en un termociclador (7300 Real Time PCR System, AppliedBiosystems). En todos los casos se hicieron las amplificaciones por triplicado para cada muestra, aceptando como
5 válidas desviaciones estándar inferiores a 0.3 entre las CTs de las tres réplicas.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: a: 50°C 2 minutos, b: 95°C 10 minutos, c: 95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto, durante 40 ciclos, d: 95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto, 95°C 15 segundos.

10

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático SPSS 13 para Windows usando el test de la U de Mann-Whitney ($p < 0,05$) tras la verificación de la homogeneidad de varianzas.

15

II.- RESULTADOS

Tras realizar la electroforesis cargando igual cantidad de ARN total en un chip de RNA de AGILENT y mediante un 2100 BIONALYZER se puede apreciar que la banda más potente que aparece en las muestras de hembra pertenece a ARNr 5S, mientras que las 2
20 bandas más fuertes de machos pertenecen a 18S y 28S ARNr (Figura 1).

Por otro lado, una vez realizada la qPCR, se encontraron entre 6 y 10 ciclos de amplificación de diferencia entre machos y hembras en todos los casos (en todos los estuarios y meses estudiados). Esto significa que las hembras superan a los machos en más de un millón de moléculas de ARNr 5S. Los machos intersex muestran niveles de
25 expresión entre machos y hembras, que permiten su diferenciación de ambos sexos en septiembre y enero, pero no en noviembre (Figura 2).

La aproximación metodológica llevada a cabo en el presente ejemplo, permite distinguir por comparación gónadas de machos y hembras. De este modo, realizando el análisis RT-PCR, aparecen dos poblaciones de muestras significativamente distintas entre ellas
30 con una diferencia superior a los 5 ciclos, en donde las de menor número de ciclos pertenecen a las hembras y las de mayor número de ciclos a los machos. Se observó un comportamiento parecido en el pez cebra (*Danio rerio*) [Figura 3] y, sobre todo, en la merluza del cantábrico (*Merluccius merluccius*) [Figura 4].

EJEMPLO 2**Regulación de la transcripción del ARNr 5S ovárico y su acumulación en subunidades ribosómicas**

En eucariotas, la transcripción de ARNr 5S es mediada por la RNA polimerasa III, y es controlada por el factor de transcripción general IIIA (TFIIIA) que se une a la NTS del gen ADNr 5S (Szymański *et al.*, 2003. *Int Rev Cytol*, 231: 197-258) [Figura 5]. En oocitos de *Xenopus* TFIIIA se encuentra formando un complejo con los transcritos ARNr 5S (7S RNP) que sirven como partícula de almacenaje de ARNr 5S. TFIIIA es por tanto capaz de reconocer específicamente y unir la secuencia promotora de 5S ADNr, al igual que el producto de su transcripción. TFIIIA une pues, tanto DNA como ARNr. Los niveles de ARN mensajero de TFIIIA reflejan los niveles de ARNr 5S en *Xenopus*, siendo alrededor de 1 millón de veces superiores en oocitos que en células somáticas o espermáticas (Penberthy *et al.*, 2003. *Gene*, 305(2): 205-215). En anuros, TFIIIA se sobre-expresa durante la ovogénesis temprana constituyendo un 10% del total de las proteínas citoplasmáticas. Después su expresión decrece 5-10 veces.

En el muble, gracias a las secuencias anotadas mediante la pirosecuenciación 454 del transcriptoma multitejido normalizado de muble, se identificaron homólogos de TFIIIA de muble. En la presente invención, el análisis de estas secuencias mediante qPCR ha demostrado por primera vez que su regulación transcripcional en peces se asemeja cuantitativamente a la de ARNr 5S, tal y como ocurre en anuros. TFIIIA diferencia de esta manera machos y hembras en los 4 estuarios muestreados en julio de 2010, y a lo largo del ciclo anual analizado en el puerto de Pasaia. También diferencia a los intersex de Septiembre de 2010 y Enero de 2011. Tal y como sucede con ARNr 5S, existen entre 5 y 10 ciclos de amplificación de diferencia entre machos y hembras, con individuos intersex entre ambos sexos (Figura 6).

Algo idéntico se ha demostrado con los niveles de transcripción de 42sp43 en muble (Figura 6). También se secuenció parcialmente el gen de muble mediante pirosecuenciación, y se vio que sus niveles de transcripción son mucho mayores en ovario que en testículo. En oocitos de anfibios, el ARNr 5S, además de en 7S RNPs, se acumula en partículas ribonucleoproteicas mayores de 42S RNPs. En *Xenopus* aproximadamente el 50% del ARNr 5S oocítico está asociado a TFIIIA (7S RNPs) y la

otra mitad se encuentra en partículas de 42S RNP. Estas partículas de 42S consisten en 2 proteínas: 42sp50 (o p48) y 42sp43 (o p43). La proteína 42sp43 es estructuralmente muy parecida a TFIIIA, pero al contrario que TFIIIA no es capaz de unirse al gen y no está implicada en la regulación de la transcripción. Por tanto, tan sólo une la molécula
 5 de ARNr participando en su acumulación citoplasmática (al menos en *Xenopus*). Una línea transgénica de medaka construida con una secuencia relativamente corta de la región promotora de 42sp50 permitió el marcaje fluorescente de oocitos. La fluorescencia comenzaba el día 5 tras la puesta del huevo. Esto concuerda con la expresión de 42sp43 en el estadio diploteno de los oocitos.

10 **Transporte nucleocitoplasmático de proteínas**

En células eucarióticas, el transporte bidireccional de moléculas al núcleo, que necesariamente afecta a moléculas como TFIIIA y ARNr 5S, se basa en el transporte a través de los poros nucleares. Moléculas con un tamaño de 45 kDa no pueden pasar de manera pasiva, y por como consecuencia deben de ser activamente transportadas vía
 15 proteínas como las karioferinas. Estas incluyen miembros de las familias de las importinas y las exportinas. El mecanismo mejor caracterizado de importación nuclear esta mediado por los heterodímeros de importina- α e importina- β . Las proteínas nucleares se unen específicamente a IMP α -s en el citosol y el complejo es dirigido por IMP β -s al poro nuclear. Las exportinas participarían en el proceso opuesto de
 20 exportación de moléculas de RNA y partículas ribonucleoproteicas al citosol.

El análisis mediante qPCR demostró que IMP α 1 se transcribe en testículo y ovarios pero no en otros tejidos. Análisis sistemáticos de IMP α 1 y 2 en *Xenopus* han demostrado que estas muestran un patrón de expresión similar a TFIIIA y ARNr 5S. Por tanto, TFIIIA puede ser importado en el núcleo mediante la interacción de estas 2
 25 proteínas. En la presente invención, se ha secuenciado IMP α 1 y 2 e IMP β 2 en muble (también por pirosecuenciación). Ambas IMP α -s siguen el patrón de transcripción de TFIIIA en muble (Figura 7). En cambio IMP β 2 y las exportinas 5 y 6 (se han caracterizado 4 exportinas de muble) no. Esto prueba la utilidad de las importinas alfas como marcadores de género, así como potentes marcadores (especialmente IMP α 1) de
 30 machos intersex.

REIVINDICACIONES

1. Uso del ARN ribosómico 5S (ARNr 5S) como marcador para identificar el sexo de los peces.
5
2. Uso del ARN ribosómico 18S (ARNr 18S) o del ARN ribosómico 28S (ARNr 28S), como marcador para identificar el sexo en peces.
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que los peces se seleccionan del grupo que
10 consiste en muble, pez cebrá, y merluza.
4. Método para determinar el sexo de un pez que comprende detectar la expresión del ARNr 5S, del ARNr 18S y del ARNr 28S en una muestra biológica de las gónadas de dicho pez, en donde
15
 - si la expresión del ARNr 5S detectada es mayor que la expresión del ARNr 18S o del ARNr 28S detectada, entonces el pez es de sexo femenino, o
 - si la expresión del ARNr 18S o del ARNr 28S detectada es mayor que la expresión del ARNr 5S detectada, entonces el pez es de sexo masculino.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que la detección de la expresión del ARNr se realiza mediante electroforesis.
6. Método para clasificar por sexos una población de peces, en donde dicho método comprende
25
 - (i) determinar el nivel de expresión del ARNr 5S en las gónadas procedentes de dicha población de peces, y
 - (ii) observar el patrón de distribución de los niveles de expresión obtenidos, en donde si aparecen dos poblaciones muestrales significativamente distintas entre sí, entonces los individuos que forman parte de la población muestral que presenta
30 el mayor nivel de expresión son hembras, y los individuos que forman parte de la población muestral que presenta el menor nivel de expresión son machos.

7. Método según la reivindicación 6, en el que los individuos de la población de peces cuyos niveles de expresión estén significativamente desviados de la media de los niveles de expresión de cada una de las poblaciones muestrales, son machos intersex.
- 5
8. Método según la reivindicación 6 ó 7, en donde el nivel de expresión se mide mediante el empleo de una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR).
- 10
9. Método según la reivindicación 8, en el que el valor Ct de la población que presenta el menor nivel de expresión medio es igual o mayor en 5 unidades que el valor Ct de la población que presenta el mayor nivel de expresión medio.
- 15
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el pez o la población de peces se selecciona del grupo que consiste en muble, pez cebra y merluza.

Chelon labrosus

JULIO

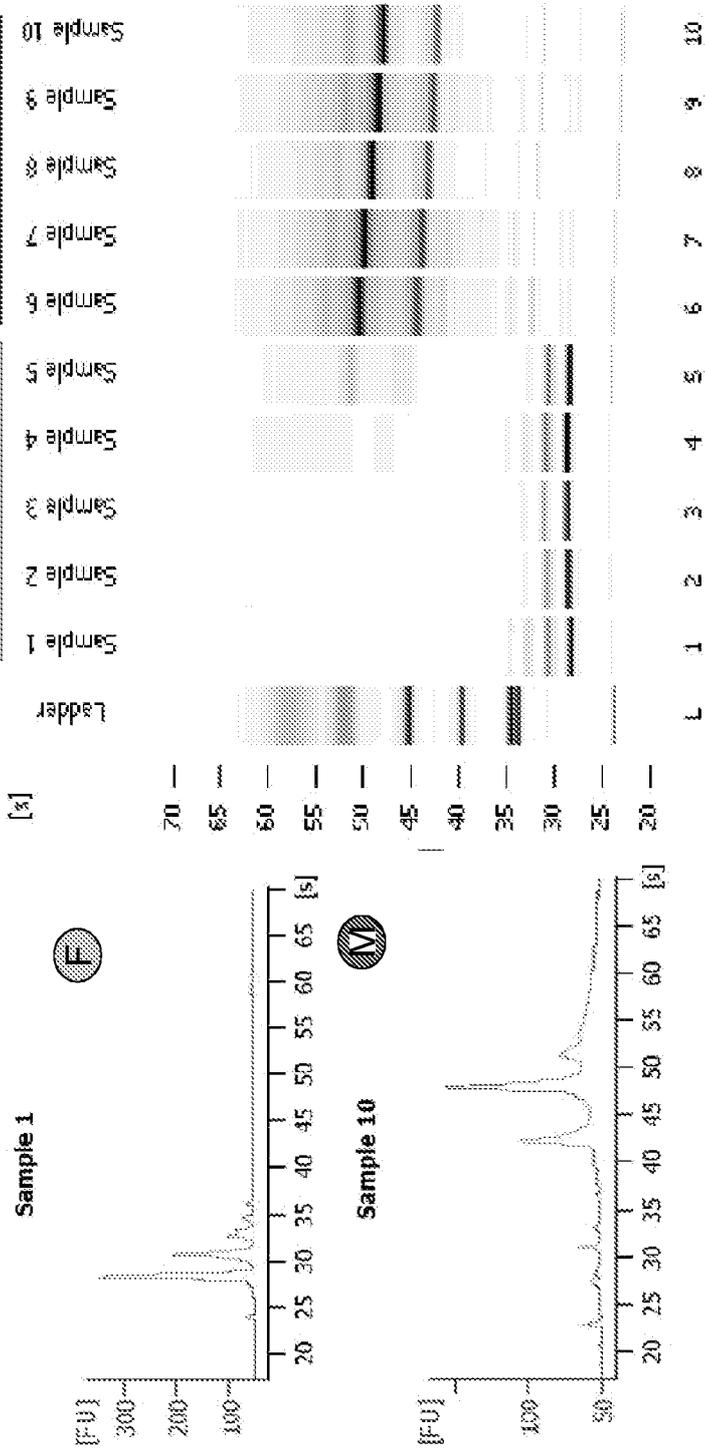


FIGURA 1

Chelonia labrosus

5S rRNA

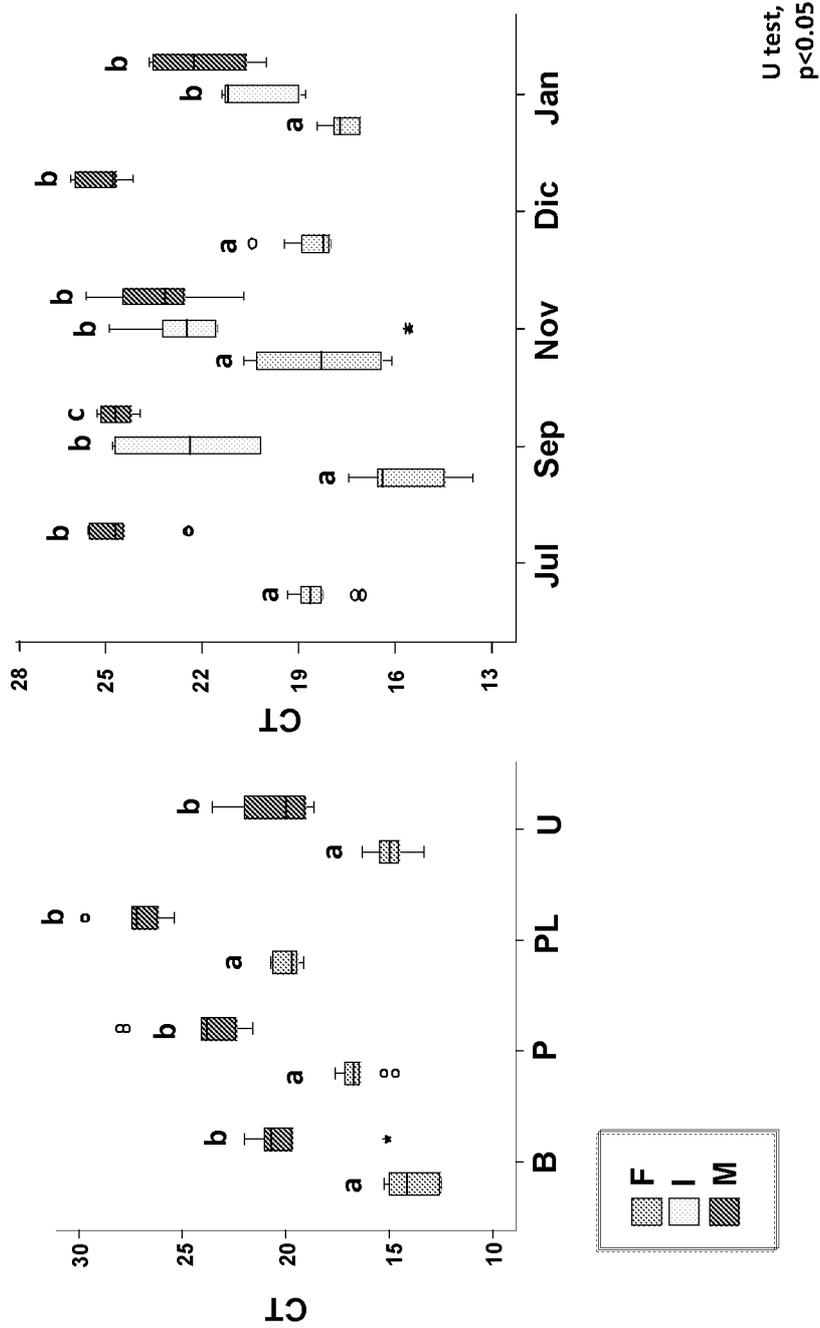


FIGURA 2

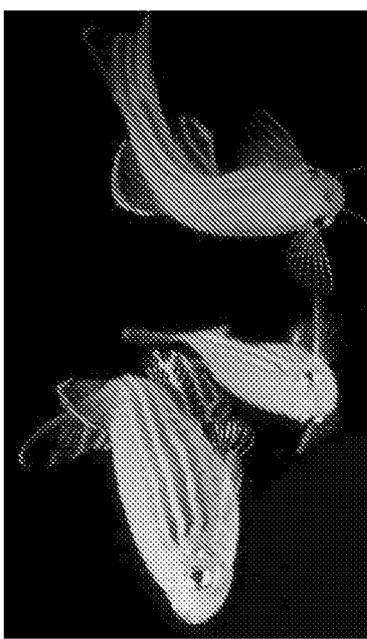
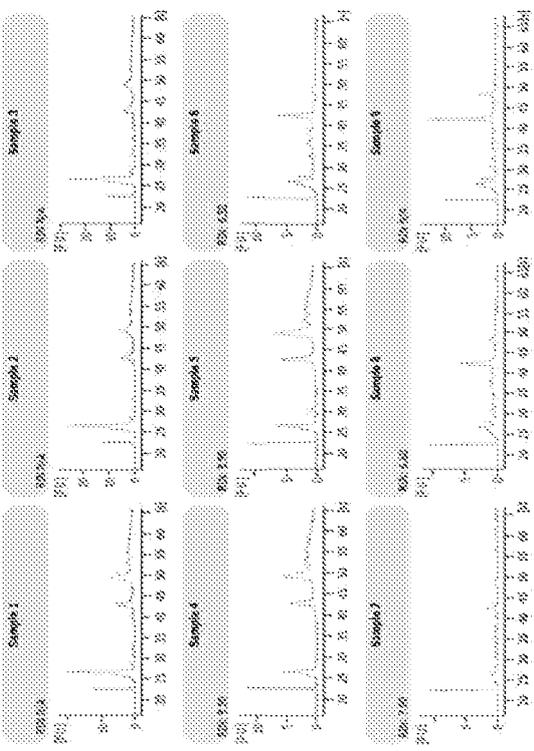
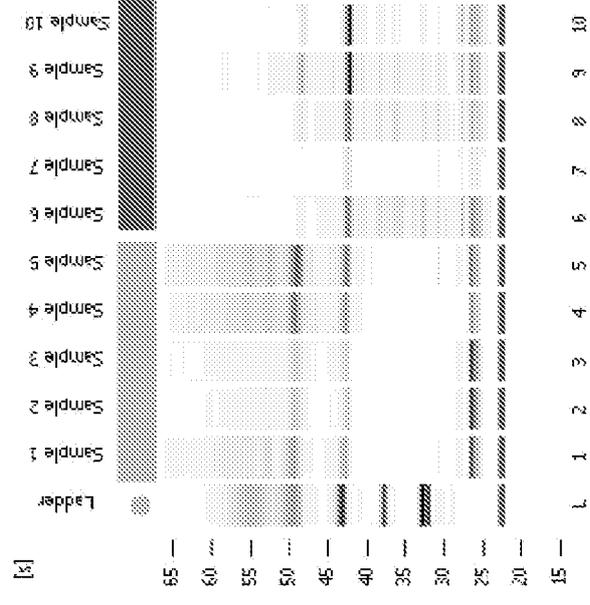
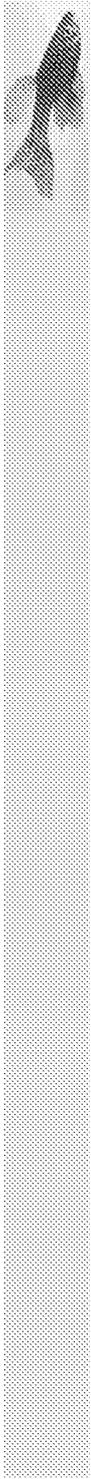


FIGURA 3

Merluccius merluccius gónada

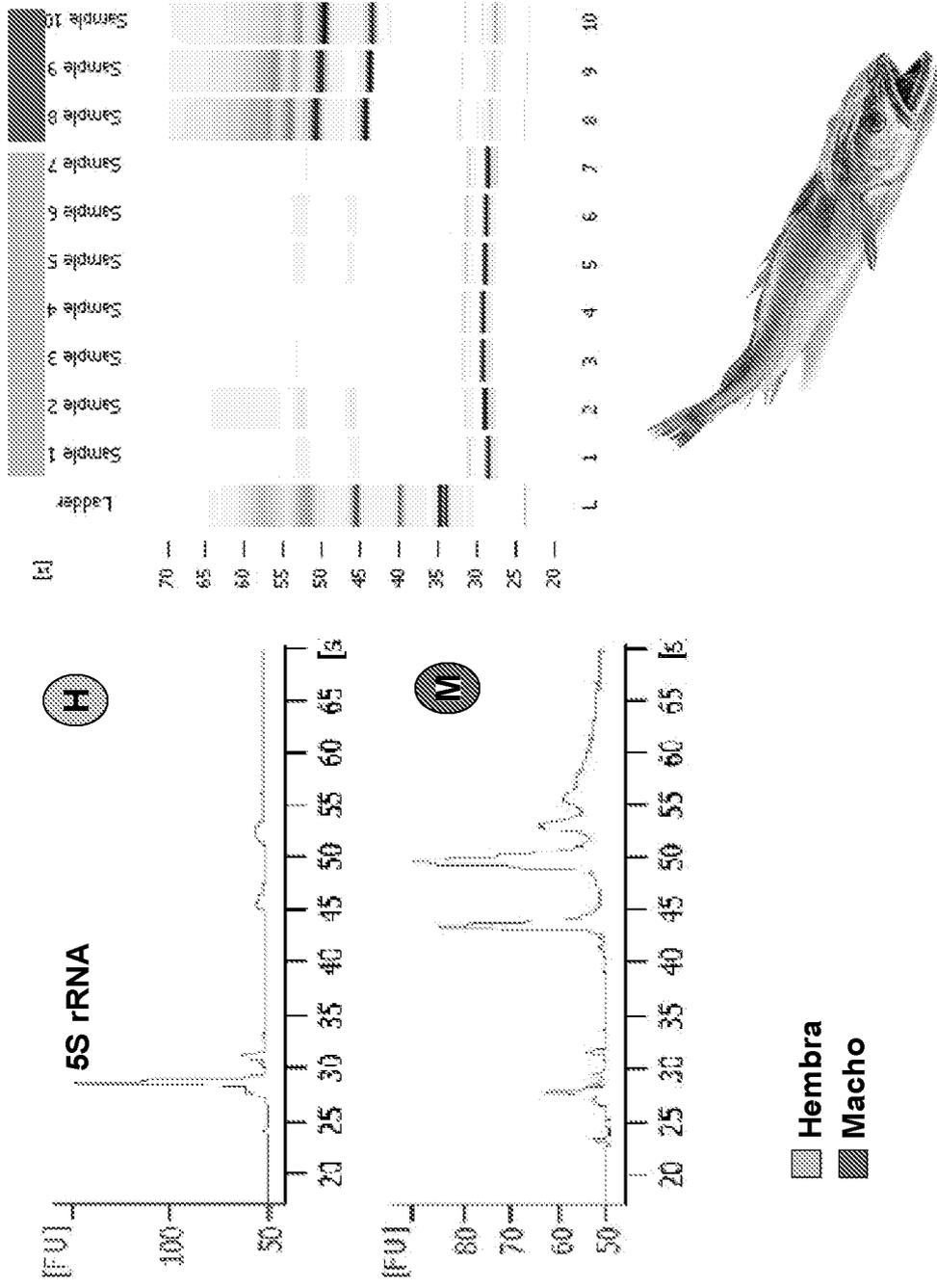


FIGURA 4

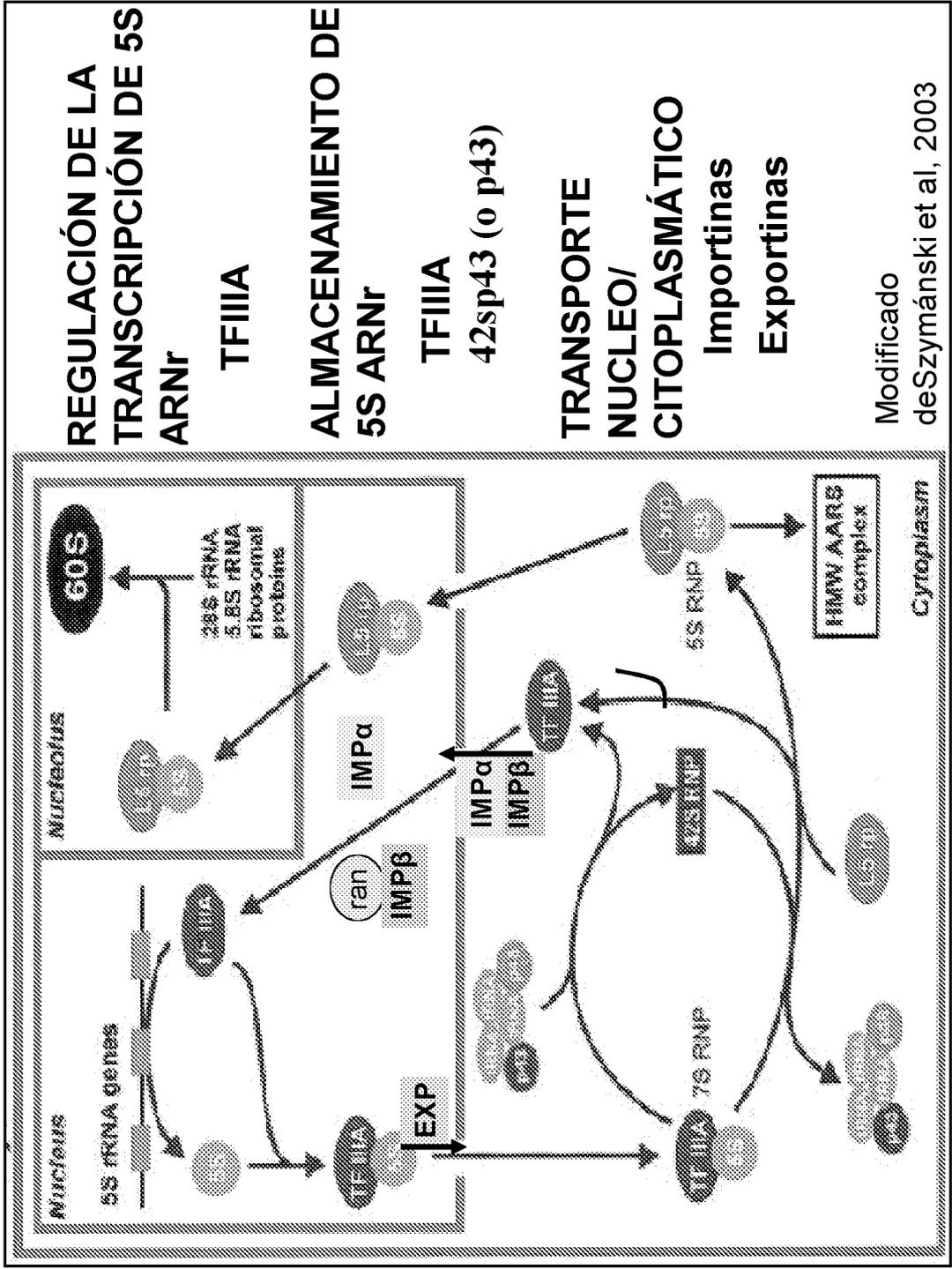


FIGURA 5

GENES QUE CODIFICAN PROTEINAS RELACIONADAS CON 5S ARNr

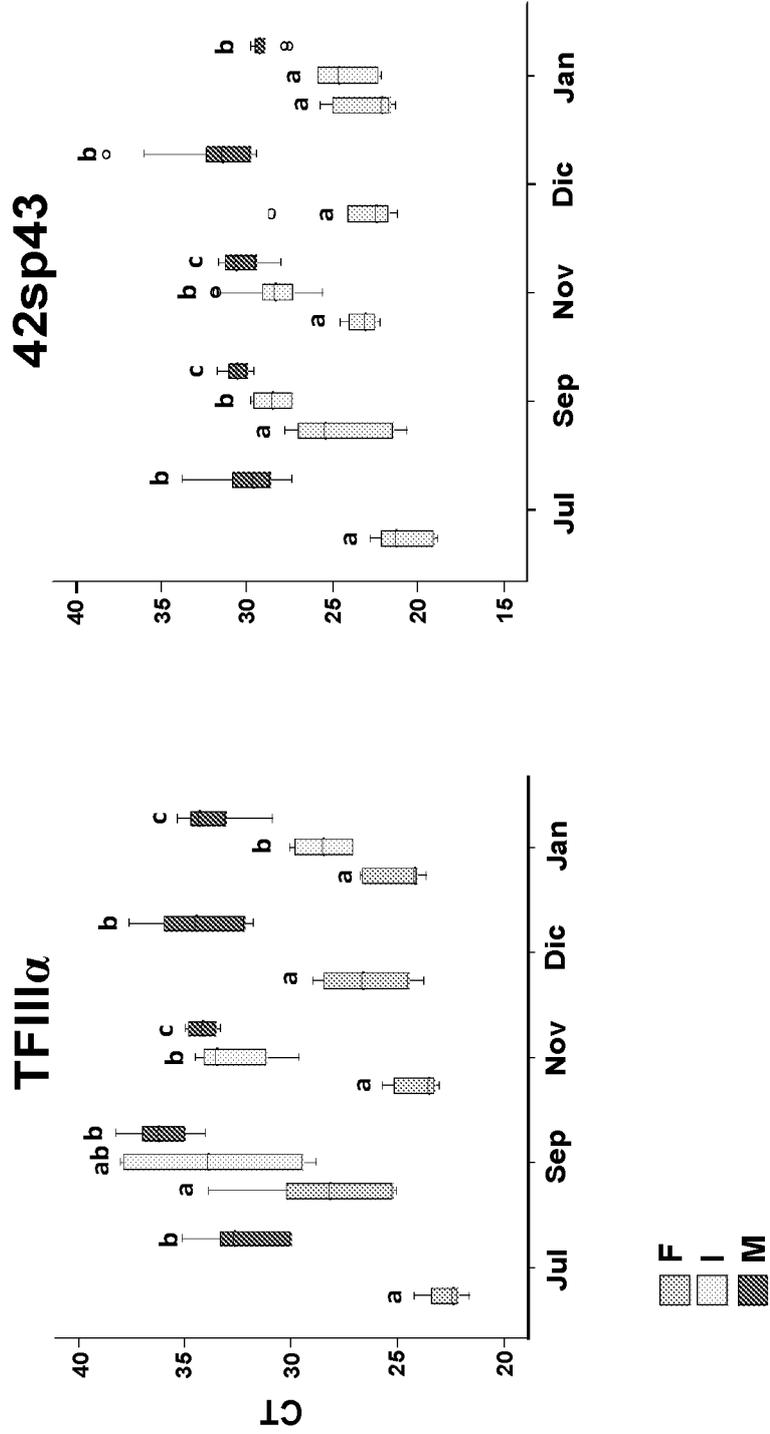


FIGURA 6

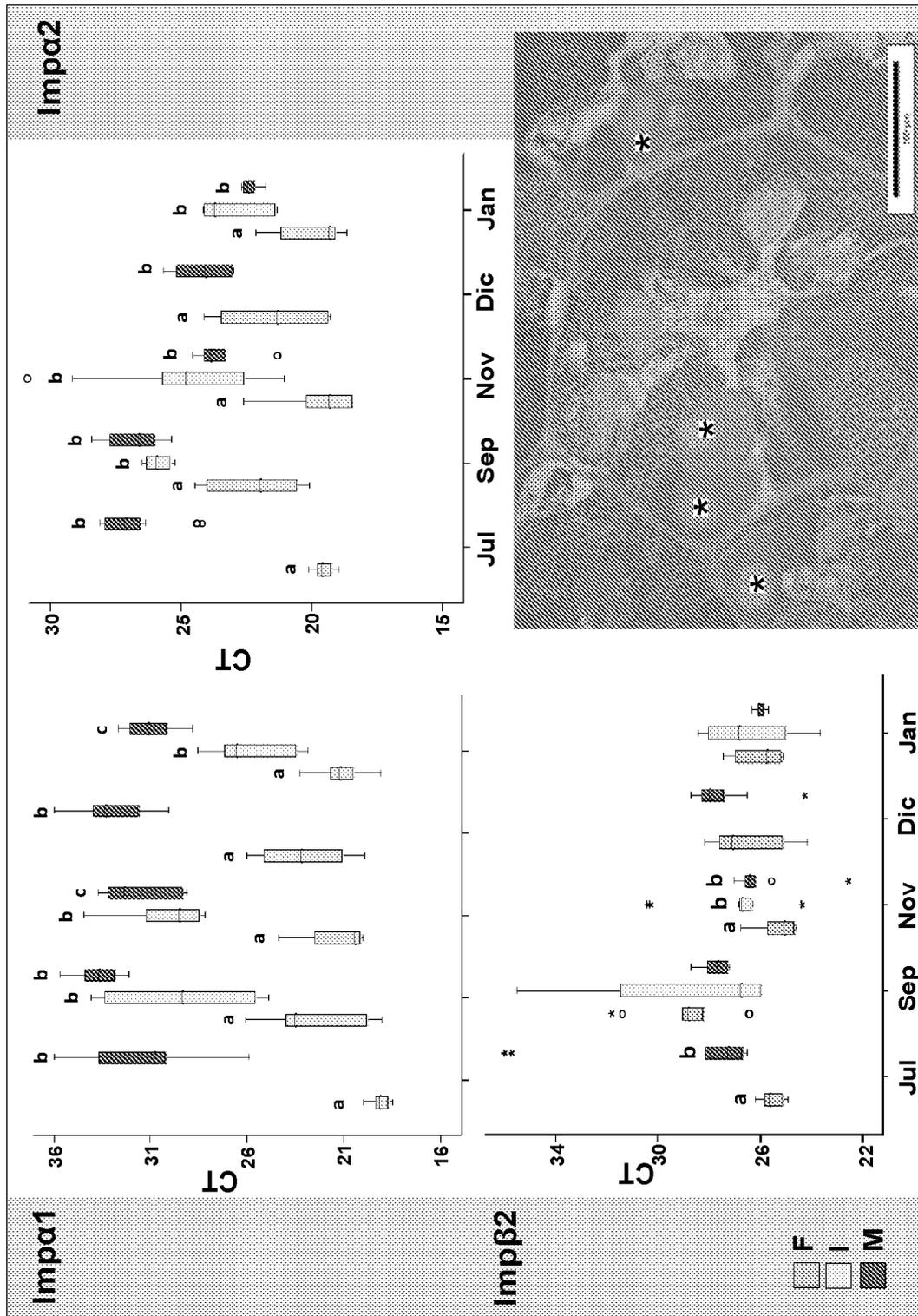


FIGURA 7

ES 2 392 604 A1

SEQUENCE LISTING

<110> Universidad del País Vasco

<120> METHOD FOR IDENTIFYING THE SEX OF FISH

<130> P7189ES00

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1118

<212> DNA

<213> Chelon labrosus

<400> 1

```
ttaaaatttt cactccacta gtaataggaa cattcacatc atagtaatgc acaagatctc      60
tgatctcgga ggctaagcag ggtcaggcca ctgcaacact aaagctgtga ctcagtcttc      120
aaaggcacia attacatcaa aggcacgaat tacatcaaag ccacgaatta catcaaagcc      180
acgaattaca tcaaaggcat gaattacatc aaagggcacg aattacatca aaggaaacat      240
tcacttggaa gaagttgcoct agtcatgaaa gcaacttagac tgcttcccca ttcaacaatg      300
aagttgtgac atcatcttca aaggcatgaa ttacatcaaa gcaacaaatt tcatggaaga      360
tgttgcctac tcataaaacc aattagactg cttccccatg caactatgat attgtgacac      420
atctcaaaag gcatgatata catctaagga aacattcact tggaggatgt tgcctagtca      480
tgaaagcaaa taagcgccat ccccatggaa ccattgcatt gtgacaaatc tcaaaaggca      540
tgaatcacat caaaggatac aattcacttg gagcatgttg cctagtcatg aaagcaatta      600
agcgccttcc ccatggaacc attgcattgt gacaaatctc aaaagccatg aatcacatca      660
aaggatacat tcacttggaa gatgttacct acttataaag gcaattagge acctttaaca      720
tgcaaccatg atattgtgac acatctcaaa agacacgagt cacatcaaag gaaacattca      780
cttggaagat gttgcctcgt tatgaaagca cttagaccgc ttccccatgc gacactgaag      840
ttgtgacaca atcttcaaag gcaaccatta catcaaagga aacattcact tggagatgt      900
tacctacaca taacaagtac aggaacattc acatcataat gatgcacacg atgggtgattt      960
ccatcatcta ttaatactct tttgtgatca ctgccatcgc ttacggccat accaccctga     1020
acacgcccga tctcgtctga tctcgggaagc caagcagggg agggcctggg tagtacttgg     1080
atgggagacc gcctgggaat accaggtgct gtaagctt                               1118
```

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

ES 2 392 604 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer for amplifying 5S rRNA

<400> 2

cttacggcca taccaccctg

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Reverse primer for amplifying 5S rRNA

<400> 3

gtatcccagg cggtctcc

18



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130778

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.05.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	DENIS, H. et al., 'Biochemical research on oogenesis. Oocytes and liver cells of the teleost fish Tinca tinca contain different kinds of 5S RNA', DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 1977, Vol. 59, No. 2, páginas 228-236, ISSN: 0012-1606, Resultados, Figura 1, Discusión.	1-10
Y	MAZABRAUD, A. et al., 'Biochemical research on oogenesis. RNA accumulation in the oocytes of teleosts', DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 1975, Vol. 44, No. 2, páginas 326-332, ISSN: 0012-1606, Resultados, Figuras 1-3, Tabla 1, Discusión.	1-10
A	WEGNEZ, M. et al., 'Biochemical research on oogenesis. RNA accumulation during oogenesis of the dogfish Scyliorhinus caniculus', DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 1978, Vol. 62, No. 1, páginas 99-111, ISSN: 0012-1606, todo el documento.	1-10
A	VAN DEN EYNDE, H. et al., 'Biochemical research on oogenesis. RNA accumulation in the oocytes of the newt Pleurodeles waltl', DEVELOPMENT, 1989, Vol. 106, No. 1, páginas 11-16, ISSN: 0950-1991, todo el documento.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.10.2012

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
1/5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201130778

22 Fecha de presentación de la solicitud: 13.05.2011

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

51 Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	VON SCHALBURG, K.R. et al., 'Regulation and expression of sexual differentiation factors in embryonic and extragonadal tissues of Atlantic salmon.', BMC GENOMICS, 13-01-2011, Vol. 12, página 31. ISSN: 1471-2164, todo el documento.	1-10
A	KANAMORI, A., 'Systematic identification of genes expressed during early oogenesis in medaka', MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, 2000, Vol. 55, No 1, páginas 31-36, ISSN: 1040-452X, todo el documento.	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.10.2012

Examinador
J. L. Vizán Arroyo

Página
2/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-10	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-10	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DENIS, H. et al., <i>Dev. Biol.</i> , (1977), 59(2): 228-36.	1977
D02	MAZABRAUD, A. et al., <i>Dev. Biol.</i> , (1975), 44(2): 326-32.	1975
D03	WEGNEZ, M. et al., <i>Dev. Biol.</i> , (1978), 62(1): 99-111.	1978
D04	VAN DEN EYNDE, H. et al., <i>Development</i> , (1989), 106(1): 11-6.	1989
D05	VON SCHALBURG, K.R. et al., <i>BMC Genomics</i> , (Ene 2011), 12: 31.	2011
D06	KANAMORI, A. et al., <i>Mol. Reprod. Dev.</i> , (2000), 55(1): 31-36	2000

En D1-D4 se describen la síntesis y acumulación de RNAs durante la ovogénesis de diferentes especies de teleósteos y anfibios.

En D5-D6 se divulgan diferentes factores de diferenciación sexual en teleósteos.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).**

- 1.1. El objeto de las reivindicaciones 1 y 2 consiste básicamente en el uso del producto ARNr 5S y de los ARNr 18S y ARNr 28S como marcadores para identificar el sexo de los peces. En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D7, no se ha divulgado el uso de un marcador del sexo de los peces que comparta las mismas características técnicas que las reivindicadas en la solicitud internacional.
- 1.2. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-10, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).**2.1. Reivindicaciones independientes 1, 2, 4 y 6.**

- 2.1.1. Los documentos D1-D2 constituyen el estado de la técnica más próximo. En ellos se describe la acumulación de ARNr ribosómico 5S en ovocitos inmaduros de diferentes especies de teleósteos. En concreto, en D1 y D2 se describe la acumulación de grandes cantidades de ARNr 5S y la ausencia casi total de las especies moleculares ARNr 18S y ARNr 28S en ovocitos inmaduros de peces (cf. D1: Resultados, Figura 1, Discusión. D2: Resultados, Figuras 1-3, Tabla 1, Discusión).
- 2.1.2. El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación independiente 1 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de un nuevo uso de ARNr 5S y de ARNr 18S y ARNr 28S.
- 2.1.3. La solución propuesta en las reivindicaciones 1 y 2 consiste básicamente en el uso de ARNr 5S y de ARNr 18S y ARNr 28S como marcadores para identificar el sexo de los peces. Según la descripción, dicho uso se basa en el resultado obtenido del análisis del ARNr total extraído de las gónadas de peces, según el cual las gónadas de una hembra acumulan en mayor cantidad la especie ARNr 5S y las de un macho las especies ARNr 18S y ARNr 28S (cf. Página 4, líneas 1-10). Como esta característica técnica ya había sido descrita en D1-D2, se concluye que la solución propuesta por la solicitud de patente al problema técnico planteado sería evidente para el experto en la materia. Por ello, el objeto de las reivindicaciones independientes 1, 2, 4 y 6 puede considerarse que no es inventivo. Según lo anteriormente expuesto, el objeto de las reivindicaciones dependientes 2, 3, 5, 7-10 también se considera que es no inventivo.
- 2.2. La presente invención no satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-10 no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.