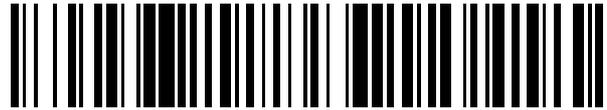


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 696**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2002 E 02756158 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 1410012**

54 Título: **Determinación del estado de gestación**

30 Prioridad:

19.06.2001 US 299553 P

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

07.06.2013

73 Titular/es:

**IDAHO RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
MORRILL HALL 103, UNIVERSITY OF IDAHO
MOSCOW, IDAHO 83844-3003, US**

72 Inventor/es:

OTT, TROY, L.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 406 696 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

Determinación del estado de gestación

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a los métodos para determinar el estado de gestación de ungulados rumiantes y no rumiantes, así como de animales rumiantes sin pezuña.

10 **Antecedentes de la invención**

En la cría de ganado, es muy importante determinar de forma precisa el estado de gestación de los animales. En particular, la identificación precisa y temprana de la concepción fallida de un animal que ha sido fecundado resulta importante desde un punto de vista económico. En la actualidad, una vez que un animal es fecundado, por ejemplo una vaca, el estado de gestación se determina mediante métodos como la palpación, que no permite una determinación precisa del estado de gestación hasta 30 días después de la fecundación. Dado que el ganado tiene un ciclo estral de unos 21 días, esto significa que con los métodos disponibles en la actualidad se pierde al menos una oportunidad de fecundar a un animal que no ha conseguido concebir, es decir el ciclo estral inmediatamente posterior a la fecundación fallida.

Esto tiene importantes consecuencias económicas para el sector ganadero y especialmente para el sector lechero. Una explotación lechera eficiente exige que las vacas sean fecundadas con éxito para que comiencen un nuevo estado de gestación entre 80 y 100 días después de parir. No obstante, las vacas lecheras tienen una tasa de fertilidad baja con la inseminación artificial y precisan una media de 2,5 a 3 inseminaciones por concepción. Por tanto, existe una necesidad significativa de un método por el que el explotador de una explotación lechera pueda determinar de forma precisa si un animal no está preñado, sin perder la oportunidad de volver a fecundar al animal en el siguiente ciclo estral tras una concepción fallida.

Sasser, Patente estadounidense nº 4.705.748, divulga un método para determinar la gestación mediante la detección de una proteína que produce un embrión. A través de este método se determinó el estado de gestación tan solo 27 días después de la fecundación. Sasser no divulga el diagnóstico de la gestación antes de ese momento, por lo que ya habrá comenzado el siguiente ciclo estral del ganado no gestante y no divulga ningún método para la determinación temprana de la fecundación fallida.

El reconocimiento maternal de la gestación en ungulados implica la regulación genética local y sistémica por parte del embrión que resulta en una producción reducida o alterada de la señal luteolítica, la prostaglandina F_{2a} ((PGF_{2a}); Yankey et al., Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. Journal of Endocrinology 170, R7-R11 (2001); Bazer et al., Regulation of endometrial responsiveness to estrogen and progesterone by pregnancy recognition signals during the peri-implantation period. In Molecular and Cellular Aspects of Peri-implantation Processes, pp 27-47. Ed S.K. Dey. Springer-Verlag, New York, Inc. (1995)). Esto contrasta con el reconocimiento de la gestación en los primates, que implica un efecto luteotrófico directo del cuerpo lúteo (CL) por parte de la gonadotropina coriónica producida por el embrión (Bazer et al. 1995). La señal para el reconocimiento maternal en ungulados es la secreción por parte del embrión de interferón tau (IFN τ) durante la segunda y la tercera semana de gestación (Bazer et al., 1995; Godkin et al., J. Reprod. Fert. 65:141-150(1982)). El IFN τ impide el incremento de los receptores endometriales de oxitocina y estrógeno, para anular los pulsos luteolíticos de PGF_{2a} inducidos por oxitocina, y mantiene la función del CL (Spencer et al., Endocrinology 136:4 932-4 94 4 (1995)).

El IFN τ es un miembro de la familia del IFN tipo I, que también incluye IFN α , β , y ω (Samuel, Virology 183: 1-11 (1991)), y, más recientemente, interferón δ (Lefevre, F., et al., Biochimie 80:779-788 (1998)). La señalización de IFN τ a través del receptor de IFN de tipo I y de la vía de transducción de la señal del transductor de señal de janus quinasa (JAK) y activador de transcripción (STAT) (Stewart et al., Endocrinology 142:98-107 (2001)) produce una serie de genes en el útero ovino, incluyendo la 2'-5' oligo adenilato sintetasa (Johnson et al., Biol. Reprod. 64:1392-1399 (2001)), β 2-microglobulina (Vallet et al., J. Endocrinol. 130:R1-4 (1991)), factor regulador de IFN 1 (Spencer et al., 1998), la proteína ubiquitina de reacción cruzada (Johnson et al., Biol. Reprod. 62:622-627(2000)), y la proteína Mx (Charleston and Stewart, Gene 137:327-331(1993); Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998)). A pesar de que las funciones de muchas de estas proteínas en la respuesta antiviral están bien caracterizadas, no ocurre lo mismo con sus funciones durante la gestación temprana.

Las proteínas Mx son GTPasas monoméricas, que, dependiendo de la especie del animal y del tipo de virus, son potentes inhibidores de la replicación viral (Samuel, Virology 183:1-11 (1991)). Las secuencias de proteínas Mx de diversas especies, incluyendo el ovino, bovino, porcino y equino, están a disposición del público en GenBank y tienen asignados los números de acceso GenBank X66093, U88329, M65087, y U55216, respectivamente. A pesar de que, por lo general, los efectos antivirales de Mx están dirigidos contra virus de ARN de cadena negativa (por ejemplo, ortomixovirus), su expresión es inducida en todas las células que poseen receptores de IFN de tipo I y ha

sido empleada para distinguir entre la infección bacteriana y la viral (Haller et al., Rev. Sci. Tech. 17:220-230 (1998)). Recientemente se ha demostrado que los niveles de proteína y ARNm de Mx se elevan desde el epitelio (para el día 13) hasta el miometrio (para el día 15) en la pared uterina de las ovejas preñadas y que estos niveles se mantienen elevados hasta el día 25 (Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998)). Por otra parte, los niveles de ARNm de Mx se incrementaron en el cuerpo lúteo en respuesta a las inyecciones de rolFNx en el lumen uterino (Spencer et al., Biol. Reprod. 61:464-470 (1999)).

Estos resultados indicaron que el IFN τ estaba: 1) actuando directamente sobre todos los tipos de células uterinas (es decir, epiteliales, estromales y miometriales) y sobre el CL; o 2) produciendo sustancias (citoquinas) que tienen efectos paracrin/endocrinos sobre las células uterinas y otros órganos entre los que se incluyen los ovarios; o 3) afectando a componentes de los sistemas inmunitarios circulantes y las mucosas uterinas, que posteriormente afectan a las diversas células uterinas y al CL.

No obstante, resulta poco factible medir el nivel de proteína Mx en el tejido uterino como prueba para evaluar el estado de gestación. Además de resultar un proceso invasivo, que requiere mucho tiempo y trabajo, la alteración de los tejidos uterinos necesaria para determinar los niveles uterinos de Mx tendería a tener un efecto perjudicial sobre la gestación.

Existe una necesidad importante de un método fiable, reproducible y no invasivo para determinar la gestación o la ausencia de gestación en el ganado doméstico.

Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

Se ha descubierto que la expresión de los genes que codifican varias proteínas, en adelante denominadas «proteínas inducidas por la gestación», incluyendo la 2'-5' oligoadenilato sintetasa, β 2-microglobulina, el factor regulador de IFN 1, la proteína ubiquitina de reacción cruzada y la proteína Mx, se incrementa de forma significativa en determinados animales durante el primer mes de la gestación. También se ha descubierto que el incremento de la expresión de las proteínas inducidas por la gestación no se produce en los animales que no están preñados.

En muchos animales, el aumento de la expresión de la proteína inducida por la gestación se debe a la secreción de una hormona, el interferón de tipo I, por parte del embrión, que es la señal del embrión que indica su existencia a la madre, denominada la señal del reconocimiento maternal de la gestación. Los diferentes interferones de tipo 1, incluyendo el interferón alfa (IFN α), interferón beta (IFN β), interferón omega (IFN ω), interferón delta (IFN δ), e interferón tau (IFN τ), son secretados por los embriones de las diferentes especies. Por ejemplo, el IFN τ es secretado como una hormona de reconocimiento de la gestación en los rumiantes y el IFN δ es secretado por el ganado porcino. En otras especies, como caballos y otros équidos, a pesar de que la proteína inducida por la gestación Mx se puede detectar en el útero durante la gestación temprana, hasta la fecha no se ha demostrado la secreción de un tipo de interferón I por parte del embrión de equino. Por otra parte, en equinos y otras especies cuyos embriones no producen un IFN de tipo I, resulta posible que el útero produzca interferón de tipo I en respuesta a la presencia del embrión.

En una realización, la invención es un método para determinar el estado de gestación de un animal ungulado rumiante o no rumiante, o de un animal ungulado sin pezuña. De acuerdo con esta realización de la invención, el nivel de expresión de una proteína inducida por la gestación durante la gestación temprana se determina y compara con el nivel de expresión de esa proteína inducida por la gestión durante el mismo período en una hembra no preñada de la misma especie. La proteína inducida por la gestación que se determina y compara es una proteína inducida por el interferón de tipo I, tal como se recoge en las reivindicaciones. Más preferiblemente, la proteína inducida por la gestación es la proteína Mx o la proteína ubiquitina de reacción cruzada.

Para los fines del presente, el término «proteína inducida por la gestación» se refiere a una proteína que es expresada por un gen materno y cuya expresión se produce en respuesta a la presencia de una gestación. Una proteína inducida por la gestación es distinta de una proteína que es producida por el embrión, a menos que dicha proteína sea también expresada por un gen materno y que esta expresión maternal sea inducida en respuesta a la presencia de una gestación.

Para los fines del presente, el término «gestación temprana» se refiere al tiempo que transcurre durante o después del período de señalización del reconocimiento de la gestación, en el que el nivel de una proteína inducida por la gestación se mantiene elevado en un animal preñado en comparación con otro animal no preñado de la misma especie. A pesar de que los animales que son fecundados sin éxito, es decir, que no quedan preñados, pueden pasar o no un período de señalización del reconocimiento de la gestación, el término «gestación temprana» se emplea en el presente con respecto a los animales no preñados para referirse al período de tiempo en el que existiría una gestación temprana si la fecundación hubiese tenido éxito. Típicamente, el período de gestación

temprana, empleado en relación con el método de la invención, concluye aproximadamente al finalizar el primer mes después de la concepción.

Para los fines del presente, el «periodo de señalización del reconocimiento de la gestación» se refiere al tiempo durante el cual el embrión secreta una proteína u hormona, cuya secreción causa el reconocimiento por parte de la madre de la existencia del embrión. A pesar de que los animales que son fecundados sin éxito, es decir, que no quedan preñados, pueden pasar o no un periodo de señalización del reconocimiento de la gestación, el término se emplea en el presente con respecto a los animales no preñados para referirse al periodo de tiempo en el que, si la fecundación se hubiese realizado con éxito, existiría una señalización bioquímica entre el embrión y el útero.

De acuerdo con la invención, un animal que está preñado presentará un nivel notablemente superior de expresión de una o más de las proteínas inducidas por la gestación, como la proteína Mx o la proteína ubiquitina de reacción cruzada, durante la gestación temprana, como durante el periodo de señalización del reconocimiento de la gestación, del que presentará un animal no preñado de la misma especie. Un animal no preñado, independientemente de que el animal haya sido fecundado o no, presentará aproximadamente el nivel de base de la expresión de proteína inducida por la gestación, incluyendo la proteína Mx, durante este periodo.

En otra realización, la divulgación proporciona un kit para determinar el estado reproductivo de un animal de una especie en la que el embrión secreta una proteína u hormona como señal para el reconocimiento maternal de la gestación. De acuerdo con esta realización de la divulgación, el equipo incluye un recipiente para contener una muestra de ensayo, uno o más reactivos que cuando se combinan con la muestra de ensayo permiten a un operador determinar visualmente el nivel de una o más proteínas inducidas por la gestación en la muestra de ensayo, como la proteína Mx o la proteína ubiquitina de reacción cruzada, así como instrucciones para determinar el nivel de la proteína en la muestra. Preferiblemente el equipo contiene también instrucciones que permiten al operador determinar el estado de gestación del animal basándose en el nivel de proteína determinado en la muestra.

La invención se ilustra también a continuación con respecto a la proteína Mx. Una persona cualificada en el campo entenderá que la divulgación siguiente es aplicable a otras proteínas inducidas por la gestación, tales como otras proteínas inducidas por el interferón de tipo I, como proteínas inducidas por el INF τ , incluyendo 2'-5' oligoadenilato sintetasa, β 2-microglobulina, el factor regulador de IFN 1, y la proteína ubiquitina de reacción cruzada, así como la proteína Mx ilustrada. Por tanto, en la siguiente divulgación, cuando se menciona el término «proteína Mx», ésta puede ser sustituida por cualquier otra proteína inducida por la gestación.

Breve descripción de las ilustraciones

La Figura 1 es un análisis de ARNm de Mx en las PBMC (células mononucleares de la sangre periférica) en el día 26 tras la inseminación artificial en ovejas. Las bandas 1-6 representan ovejas preñadas y las bandas 8-13 representan las ovejas no preñadas. El ARNm de Mx migró aproximadamente a 2,5 kb.

La Figura 2 es una gráfica que muestra los resultados de un análisis slot-blot del ARN celular total aislado en las PBMC en el día 26 tras la inseminación artificial en las ovejas. Los niveles de ARNm de Mx fueron aproximadamente cuatro veces superiores en las ovejas preñadas en comparación con las ovejas fecundadas no preñadas en el día 26 ($P < 0,01$). Los niveles de PSPB (proteína B específica de la gestación) (\blacklozenge) confirmaron el estado de gestación y estuvieron correlacionados con el número de corderos nacidos. (CNTS en la Fig. 2 se refiere a los recuentos de fotones en el análisis Northern blot por quimioluminiscencia.

La Figura 3 es un diagrama de barras que muestra la expresión de ARNm de Mx en las PBMC de las ovejas inseminadas artificialmente preñadas y no preñadas entre el día 0 y el día 30 tras la inseminación artificial. (CNTS en la Fig. 3 se refiere a los recuentos de fotones en un análisis slot-blot por quimioluminiscencia.)

La Figura 4 es un análisis Western blot de la expresión de la proteína Mx en las PBMC de las ovejas preñadas y no preñadas, 15 y 18 días después de la inseminación artificial.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es aplicable a cualquier especie de animal ungulado rumiante o no rumiante, así como a animales ruminantes sin pezuña que secretan unos niveles incrementados de una o más proteínas inducidas por la gestación durante la gestación temprana. La especie animal es la que secreta un interferón de tipo I como una señal para el reconocimiento maternal de la gestación. Más preferiblemente, la especie animal es la que secreta la hormona IFN τ como una señal para el reconocimiento maternal de la gestación. En estos animales, los niveles incrementados de interferón de tipo I, como IFN τ , inducen una expresión incrementada de la proteína Mx durante el periodo de señalización del reconocimiento de la gestación. De acuerdo con la invención, la ausencia de un incremento de la expresión de una proteína inducida por la gestación, como una proteína Mx, en un animal adecuado durante la gestación temprana, preferiblemente el periodo de tiempo que abarcaría el periodo de señalización del reconocimiento de la gestación tras la fecundación, es una indicación positiva de que el animal no

está preñado. Por lo contrario, un resultado negativo, es decir la existencia de un incremento de la expresión de la proteína durante este periodo es indicativa de que el animal está preñado.

5 En esta aplicación, la ausencia de una expresión incrementada de la proteína inducida por la gestación, como la proteína Mx, se denomina resultado positivo, mientras que la presencia de una expresión incrementada de la proteína se denomina resultado negativo. Esta terminología, que en principio podría parecer contraria al uso habitual de los términos «resultado positivo» y «resultado negativo», se utiliza en el presente porque es la determinación de la ausencia de preñez (y no de la presencia de preñez), la que más preocupa a un agricultor o granjero o cualquier otra persona dedicada a la cría de animales. Si se determina que un animal está preñado, no se dedica ningún trabajo adicional a garantizar que esté realmente preñado, aparte de observarlo para detectar los signos de que la gestación ha concluido. Por lo contrario, si se determina que un animal no está preñado, es necesario continuar evaluándolo para detectar el comienzo de su siguiente ciclo estral y fecundarlo de nuevo. Por tanto, es la determinación de la ausencia de preñez la que da lugar a que se dedique un trabajo adicional al animal, a fin de garantizar que consiga quedar preñado.

15 Como se ha señalado anteriormente, la invención es aplicable a cualquier hembra de una especie que produzca unos niveles incrementados de una proteína inducida por la gestación durante la gestación temprana, como un animal de una especie en la que un interferón de tipo I, como IFN γ , sea la única señal o una de las múltiples señales para el reconocimiento maternal de la gestación. Los animales adecuados para el método de la invención son los ungulados rumiantes o no rumiantes, así como los rumiantes sin pezuña. Los ungulados pueden ser rumiantes, como el ganado bovino, ovino, caprino, el yak, el búfalo de agua y el bisonte. Entre los rumiantes ungulados adecuados para la invención también se incluyen los ungulados no domesticados, como antílopes, gacelas, alces comunes, renos, alces eurasiáticos, musmones, jirafas y otros miembros de las familias del ganado bovino, ovino y caprino. Los rumiantes ungulados y sin pezuña adecuados para el método de la invención incluyen el camello bactriano y el dromedario, así como otros camélidos, como llamas, alpacas y vicuñas. Los ungulados no rumiantes adecuados para la invención incluyen cerdos y caballos domesticados y no domesticados.

20 De acuerdo con el método de la invención, durante un periodo de tiempo apropiado tras la fecundación, el animal es testado para determinar la presencia, o más concretamente la no presencia, de una expresión incrementada de una proteína inducida por la gestación, ejemplificada más adelante por la proteína Mx. El test se puede realizar empleando cualquier célula en la que se exprese la proteína Mx o en cualquier fluido corporal en el que se encuentre esta proteína.

35 Para determinar si un animal presenta o no presenta una expresión incrementada de la proteína Mx se realiza una comparación con el nivel de expresión en animales que se sabe que no están preñados. La comparación se puede realizar, por ejemplo, realizando una comparación paralela de una muestra de ensayo de un animal que ha sido fecundado y cuyo estado de gestación es incierto. Alternativa y preferiblemente, la comparación se realiza testando una muestra de un animal que ha sido fecundado y cuyo estado de gestación es incierto y comparando el nivel de proteína Mx de la muestra con el nivel de proteína Mx que se sabe que está presente en los animales no preñados, es decir empleando un control histórico.

40 La invención se ilustra en el presente con referencia a la determinación de la expresión incrementada de proteína Mx en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC). No obstante, se puede emplear cualquier célula en la que se exprese la proteína Mx, incluyendo otras células nucleadas presentes en el torrente sanguíneo, en lugar de la PBMC. Del mismo modo, se entiende que una expresión incrementada de Mx de conformidad con la invención se puede determinar mediante el análisis de fluidos, como la leche, la saliva, la orina, las secreciones nasales, oculares o vaginales, la sangre, el plasma o el suero.

50 A pesar de que el periodo de reconocimiento maternal coincide aproximadamente en la mayoría de las especies, por ejemplo en los días 12 a 14 tras la fecundación en las ovejas y en los días 15 a 18 tras la fecundación en las vacas, el periodo de la señalización embrionaria que permite el reconocimiento maternal de la gestación varía ligeramente entre las diferentes especies. Por consiguiente, también variarán las fechas reales tras la fecundación en las que se puede practicar de forma efectiva el método de la invención. Por ejemplo, el periodo de reconocimiento maternal de la señalización de la gestación en la oveja domesticada comienza típicamente entre el día 11 tras la fecundación y continúa hasta aproximadamente el día 21. En el bovino, este período comienza típicamente sobre el día 13 y continúa hasta aproximadamente el día 35.

60 Cuando se compara el nivel de expresión de proteína Mx en una muestra de ensayo con el valor basal, es decir el nivel de expresión de proteína Mx (en animales no preñados), típicamente una expresión de proteína Mx multiplicada por dos o superior con respecto al valor de base es un test negativo, es decir que no se determina que el animal no está preñado. Habitualmente, a los niveles máximos de expresión de proteína Mx durante el periodo de señalización del reconocimiento de la gestación, un animal preñado presentará unos niveles de expresión de la proteína Mx hasta cuatro o cinco veces superiores (o incluso mayores) al valor basal.

De acuerdo con la invención, el método se puede practicar en cualquier momento a partir del comienzo del periodo de señalización y hasta el momento en el que el nivel de proteína inducida por la gestación ya no se mantiene elevado en los animales preñados en comparación con los animales no preñados de la misma especie. Es durante este tiempo cuando los animales preñados presentan una expresión incrementada de proteína Mx en comparación con los animales no preñados. De este modo, en la oveja y el ganado bovino, el periodo de tiempo para comparar el nivel de expresión de proteína Mx a fin de determinar el estado de gestación es de entre 12 y 30 días tras la fecundación. Un periodo de tiempo más preferible es entre los días 12 y 21 tras la fecundación. Un periodo de tiempo más preferible es entre 15 y 21 días tras la fecundación, y el momento más preferible es el día 18 en el ganado bovino y el día 15 en la oveja.

El nivel de expresión de proteína Mx se puede determinar a través de cualquier método que permita realizar esta determinación. Los métodos adecuados incluyen la detección de la proteína Mx, por ejemplo a través de un ensayo ELISA, un ensayo basado en la función de la proteína Mx o un análisis Western blot. Los métodos adecuados también incluyen la detección de unos niveles incrementados de ARNm de Mx, por ejemplo mediante un análisis Northern blot, slot-blot o PCR. En una realización preferible, el nivel de expresión de proteína Mx se determina detectando el nivel de proteína Mx presente en una muestra mediante un ensayo colorimétrico basado, por ejemplo, en la unión de un anticuerpo a la proteína Mx, de forma similar a los métodos empleados en los equipos para el diagnóstico doméstico del embarazo humano.

El método de la invención es un test preciso y reproducible que determina de forma previsible que un animal no está preñado y que se puede emplear, del mismo modo, para determinar que un animal está preñado. Con respecto a la proteína Mx en particular, aunque no necesariamente a las demás proteínas inducidas por la gestación, la única fuente de resultados falsos negativos que indicaría erróneamente que el animal está preñado, es decir un nivel incrementado de la expresión de proteína Mx, sería que el animal padeciese una infección vírica grave.

El kit de la divulgación se basa preferiblemente en un ensayo ligado a enzima (ELISA), como el conocido como ensayo «inmunométrico» o tipo «sándwich». Este ensayo implica «hacer un sándwich» de un ligando (como un antígeno) con una o más moléculas receptoras (como anticuerpos), que forman un complejo con el ligando de manera no interferente y en diferentes sitios epitópicos. Algunos ejemplos de estos ensayos se describen en David et al., Patente estadounidense nº 4.486.530. Alternativamente, el kit puede estar basado en ensayos quimioluminiscentes, ensayos de luminiscencia mejorados y radioinmunoensayos. En una realización preferible, el kit incluye un envase, que contiene una superficie de ensayo, como una platina o múltiples pocillos de ensayo, que está unida a un anticuerpo que se unirá a un epítipo de la proteína de interés, como la proteína Mx; un recipiente que contiene un segundo anticuerpo que se unirá a un segundo epítipo de la proteína, estando este segundo anticuerpo etiquetado; un recipiente que contiene una muestra patrón que presenta una concentración de referencia de la proteína; un reactivo que cuando entra en contacto con el segundo anticuerpo etiquetado permite visualizar la cantidad relativa de la proteína presente; y las instrucciones de uso del kit para determinar si una muestra de ensayo contiene una cantidad de proteína Mx indicativa del estado de gestación o de no gestación.

El kit de la divulgación para determinar el estado de gestación determinando el nivel relativo de una proteína inducida por la gestación, como la proteína Mx, en una muestra de ensayo en comparación con un control se puede formular de múltiples maneras diferentes. Estas maneras resultarán evidentes para las personas versadas en la materia tras la lectura de la descripción del presente. Se pretende que estas diversas formulaciones del kit de la divulgación estén incluidas en la invención.

La invención se describe también en los siguientes ejemplos ilustrativos de carácter no limitador. Los ejemplos describen el método de la invención con respecto a la proteína Mx. No obstante, el método de la invención es aplicable a otras proteínas inducidas por la gestación.

Ejemplo 1. Modelos animales

Sesenta (60) ovejas adultas de cara blanca procedentes de U.S. Sheep Experiment Station (USSES, Dubois ID) fueron sincronizadas y fecundadas mediante inseminación artificial (IA) transcervical o laparoscópica. La IA laparoscópica se realizó conforme al procedimiento divulgado en Stellflug et al., J. Anim. Sci. 79:568-573 (2001). El día de la inseminación artificial se designó Día 0 (D0). A los 26 días después de la IA (D26), se recogieron muestras de sangre (10 ml) mediante venopunción yugular en tubos Vacutainer que contenían EDTA (Sherwood Medical, St. Louis MO). Se aislaron las PBMC como se describe más adelante en el Ejemplo 2. La gestación se determinó sometiendo a ensayo el suero para detectar la proteína B específica de la gestación (PSPB; Biotracking Inc, Moscow ID) y se registró el número de corderos nacidos, así como las fechas.

Ejemplo 2. Aislamiento de PBMC

La sangre se mantuvo en hielo hasta su procesamiento. Las muestras se centrifugaron a 300 x g durante 20 min a 4 °C. La capa leuco-plaquetaria fue retirada y resuspendida en una solución tampón de lisis Tris-NH₄CL al 0,87%, a un ratio de 1 a 5. Las muestras fueron incubadas durante 5 min a 37 °C y se centrifugaron a 300 x g durante 10 min. El

supernatante fue retirado y los gránulos se lavaron con 10 ml de 1X PBS y se centrifugaron durante 10 min a 300 x g. Tras haber retirado el supernatante, los gránulos celulares fueron congelados a -80°C para la extracción de proteína o lisados con 2 ml de TRIZOL (Life Technologies, Grand Island NY) y almacenados a -80 °C para la extracción de ARN.

5

Ejemplo 3. Extracción de ARN, Análisis Northern blot y slot-blot.

El ARN celular total se extrajo utilizando TRIZOL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó mediante un ratio A260:280. Para establecer el tamaño y el número de transcripciones de Mx en las PBMC, el ARN (5 µg) fue sometido a electroforesis en un gel de 1% de agarosa/0,615 M de formaldehído y transferido a una membrana de nylon (Nytran, Schleicher & Schuell, Keene NH) mediante transferencia por capilaridad. Para la cuantificación de los niveles de ARNm de Mx, el ARN (5 µg) se transfirió a una membrana de nylon mediante filtración por vacío (Minifold II, Schleicher & Schuell, Keene NH). Los blots se sondaron con una sonda de ARNc antisentido de Mx ovina etiquetada con biotina (Ott et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998)) utilizando el kit North2South Hybridization (Pierce, Rockford IL) y la señal de quimioluminiscencia se cuantificó utilizando un sistema Bio-Rad Fluor-S Multimager y el software Quantity One (Bio-Rad, Hercules CA). Los análisis slot-blot fueron retirados y resondados con una sonda de ARNc de ARNr 18s ovino para corregir las variaciones en la carga de ARN.

10

15

20

El análisis Northern blot, como se muestra en la Fig.1, detectó una única banda, de aproximadamente 2,5 kD, en las PBMC aisladas de ovejas preñadas y de ovejas fecundadas pero no preñadas, lo que coincide con el tamaño conocido del ADNc de Mx uterina ovina (Charleston and Stewart, Gene 137:327-331 (1993); Otte et al., Biol. Reprod. 59:784-794 (1998)).

25

El análisis slot-blot, como se muestra en la Fig. 2, del ARN celular total aislado de las PBMC recogidas en el D26 después de la IA registró unos niveles de ARNm de Mx multiplicado por cuatro en las ovejas preñadas frente a las ovejas fecundadas no preñadas (n=26) (p<0,01). Por otra parte, las ovejas preñadas de embriones múltiples (tres o cuatro; n=10) presentaban unos niveles de ARNm de Mx superiores a las preñadas de un único embrión (n=10) o de dos (n=9; p<0,05). Los resultados del ensayo de la PSPB (proteína B específica de la gestación) confirmaron el estado de gestación y, como se ha señalado anteriormente, los niveles de PSPB estaban correlacionados con el número de corderos nacidos (Willard et al., J. Anim. Sci. 73:960-966 (1995)).

30

Ejemplo 4.

Expresión temporal de ARNm de proteína Mx durante la gestación temprana en la oveja. Un segundo estudio examinó la expresión temporal de ARNm de Mx durante la gestación temprana en la oveja, tal como se muestra en la Fig. 3. Treinta y cuatro (34) ovejas Suffolk adultas fueron sincronizadas y fecundadas mediante IA laparoscópica. Se tomaron muestras de sangre (20 ml) mediante venipunción yugular en el D0, y cada tres días desde el D9 hasta el D30, y se aislaron las PBMC. La gestación se confirmó mediante ultrasonografía en tiempo real y ensayo de PSPB en el D30. Los resultados mostrados en la Fig. 3 son un subconjunto representativo de todas las ovejas e ilustra los resultados de cuatro ovejas preñadas y cuatro ovejas fecundadas no preñadas durante los 30 primeros días tras la inseminación. Esto permitió analizar todos los replicados en un único ensayo blot, para eliminar los problemas asociados con la intensidad de la señal entre blots. Los resultados mostraron unos niveles de ARNm de Mx incrementados en las ovejas preñadas a partir del D15 (p<0,01). Los niveles alcanzaron máximos en el D21 y posteriormente fueron descendiendo gradualmente. En el D30, los niveles de Mx en las ovejas preñadas se mantenían elevados, siendo dos veces superiores en comparación con los de las ovejas fecundadas no preñadas (p<0,01).

35

40

45

Ejemplo 5. Aislamiento de proteína y análisis Western blot.

La proteína celular total se extrajo utilizando un reactivo M-PER (Pierce, Rockford IL), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La concentración de proteína de las muestras se cuantificó mediante ensayo BCA (Pierce, Rockford IL) con albúmina de suero bovino como patrón. Las proteínas (8 µg/muestra) de las PBMC aisladas de las ovejas preñadas y fecundadas pero no preñadas en los D15 y D18 se separaron mediante SDS-PAGE al 12% y se transfirieron por electroforesis a una membrana de nitrocelulosa (BA83, Schleicher & Schuell, Keene NH). Después de bloquear los sitios de unión no específicos en leche deshidratada desnatada al 5% en tampón Tris salino y Tween 20 (TBST) durante dos horas a 25°C, las membranas fueron incubadas con una dilución de 1:1000 de un antisuero policlonal de conejo contra péptido de Mx ovina (#90618-2; 0,7µg/ml) a 4°C durante una noche. La IgG de cabra anti-conejo (0,8 µg/ml) etiquetada con peroxidasa de rábano se empleó a una dilución de 1:200.000 como anticuerpo secundario. La señal quimioluminiscente se desarrolló empleando el West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford ID) y se cuantificó utilizando el sistema Fluor-S Multimager y el software Quantity One.

50

55

60

Tal como se muestra en la Fig. 4, la proteína Mx (-75 kDa) no se detectó en el D15 ni en el D18 en las ovejas no preñadas, aunque se encontró notablemente regulado al alza en las PBMC de las ovejas preñadas en ambos días. En las PBMC de las ovejas preñadas se detectaron dos bandas adicionales (-48 y 36 kDa).

5 **Ejemplo 6. Análisis.**

10 La señal quimioluminiscente se analizó empleando procedimientos de GLM del SAS (Versión 8.1, SAS Inc, Gary NC). El modelo incluía, cuando resultaba apropiado, el estado (de gestación frente a fecundación sin gestación), la oveja anidada dentro del estado, el día (0, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, y 30) y las interacciones apropiadas. Los términos de error en el test F se ajustaron a las expectativas de cuadrados medios de error. La señal para ARNr 18s se ejecutó como una covariable en el modelo, a fin de corregir las variaciones en la carga. Los resultados se indican como medias de mínimos cuadrados (LSM) y errores estándar agrupados.

15 **Ejemplo 7. Bovino**

20 Se fecundó a 33 vacas lecheras mediante inseminación artificial y sus niveles de ARNm de Mx se determinaron por el método anteriormente descrito en los Ejemplos 2 y 3. El día 15, los niveles de ARNm de Mx encontrados fueron aproximadamente los mismos en las vacas que posteriormente se determinó que estaban preñadas que en las vacas que posteriormente se determinó que no estaban preñadas. El día 18, se apreció que los niveles de ARNm de Mx habían aumentado de forma notable en las vacas que posteriormente se determinó que estaban preñadas, hasta unos niveles aproximadamente tres veces superiores a los encontrados en las vacas que posteriormente se determinó que no estaban preñadas.

25 Los resultados demuestran una activación rápida y sostenida de la expresión del gen de Mx en respuesta a la señalización del reconocimiento de la gestación e indican, además de los efectos locales del IFN γ , que existe una rápida respuesta sistémica en la oveja y la vaca. Por otra parte, la expresión de MX no incrementó en las PBMC cuando no se produjo una gestación (en los animales fecundados pero no preñados). Estas conclusiones son significativas porque en consecuencia se consideró que la señalización del reconocimiento de la gestación por el IFN γ resultaba solamente de la regulación local de la expresión génica endometrial (Stewart et al., *Endocrinology* 142:98-107 (2001); Johnson et al., *Biol. Reprod.* 64:1392-1399 (2001); Vallet et al., *J. Endocrinol.* 130:R1-4 (1991); Spencer et al., *Biol. Reprod.* 58:1154-1162(1998); Johnson et al., *Biol. Reprod.* 62:622-627 (2000); Charleston y Stewart, *Gene* 137:327-331(1993); Ott et al., *Biol. Reprod.* 59:784-794 (1998); Spencer et al., *Biol. Reprod.* 61:464-470 (1999)) y que la supresión de la expresión del receptor de oxitocina y estrógeno anula los pulsos luteolíticos de la PGF α . Por tanto, los métodos y kits de la invención proporcionan métodos nuevos e importantes desde el punto de vista económico para determinar la gestación o no gestación en el ganado.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar el estado de gestación en un animal ungulado rumiante o no rumiante, así como en un animal rumiante sin pezuña, que comprende, por una parte, la determinación del nivel de expresión extrauterina de una proteína inducida por la gestación seleccionada del grupo compuesto por 2'-5' oligoadenilato sintetasa, proteína ubiquitina de reacción cruzada y proteína Mx en un fluido corporal recogido del animal durante los 12-30 días siguientes a la fecundación y, por otra, la comparación del nivel de expresión de la mencionada proteína en el animal con el de un animal no preñado de la misma especie.
- 10 2. El método de la reivindicación 1 donde el animal es un rumiante.
- 15 3. El método de la reivindicación 2 donde el rumiante se selecciona del grupo compuesto por el camello bactriano, el dromedario, la llama, la alpaca y la vicuña.
4. El método de la reivindicación 2 donde el animal es un ungulado.
- 20 5. El método de la reivindicación 1 donde el animal se selecciona del grupo compuesto por la vaca, la oveja, la cabra, el yak, el búfalo de agua, el bisonte, el antílope y el ciervo.
6. El método de la reivindicación 5 donde el animal es una oveja o una vaca.
- 25 7. El método de la reivindicación 1 donde el animal es un ungulado.
8. El método de la reivindicación 7 donde el animal es un cerdo.
9. El método de la reivindicación 1 donde la proteína es una proteína Mx.
- 30 10. El método de la reivindicación 1 donde el nivel de expresión de la proteína se determina estableciendo el nivel de codificación de ARNm para la proteína.
- 35 11. El método de la reivindicación 10 donde la determinación del ARNm se realiza mediante un análisis Northern blot, un análisis slot-blot o una reacción en cadena de polimerasa.
- 40 12. El método de la reivindicación 1 donde el nivel de expresión de la proteína se determina estableciendo el nivel de la proteína.
13. El método de la reivindicación 12 donde la determinación del nivel de producción de la proteína se consigue evaluando la unión de un anticuerpo a la proteína o mediante un ensayo basado en una función de la proteína.
- 45 14. El método de la reivindicación 12, donde el nivel de producción de la proteína se detecta mediante un ensayo colorimétrico.
15. El método de la reivindicación 1 donde el nivel de expresión de la proteína se determina estableciendo la expresión de la proteína en una célula del animal.
- 50 16. El método de la reivindicación 15 donde la célula es una célula sanguínea nucleada.
17. El método de la reivindicación 16 donde la célula es una célula mononuclear de la sangre periférica.
- 55 18. El método de la reivindicación 1 donde el fluido corporal se selecciona del grupo compuesto por leche, saliva, orina, secreciones nasales, oculares o vaginales.
19. El método de la reivindicación 1 donde el fluido corporal es sangre, plasma o suero.
- 60 20. El método de la reivindicación 1 donde se determina que el animal no está preñado si el nivel de expresión de la proteína en el animal no es elevado en comparación con el nivel de expresión de la proteína en un animal no preñado de la misma especie.
21. El método de la reivindicación 1 donde se determina que el animal está preñado si el nivel de expresión de la proteína en el animal es el doble al menos que el nivel de expresión de la proteína en un animal no preñado de la misma especie.

22. El método de la reivindicación 21 donde se determina que el animal está preñado si el nivel de expresión de la proteína en el animal es el cuádruple al menos que el nivel de expresión de la proteína en un animal no preñado de la misma especie.
- 5 23. El método de la reivindicación 1 donde la comparación es una comparación paralela del nivel de expresión de la proteína en el animal y el nivel de expresión en un animal que se sabe que está preñado o que no está preñado.
24. El método de la reivindicación 1 donde la comparación se realiza utilizando un control histórico.
- 10 25. El método de la reivindicación 1 que se realiza durante el período de los 15-30 días siguientes a la fecundación del animal.
26. El método de la reivindicación 25 que se realiza durante el período de los 12-21 días siguientes a la fecundación del animal.
- 15 27. El método de la reivindicación 26 que se realiza durante el período de los 18-21 días siguientes a la fecundación del animal.

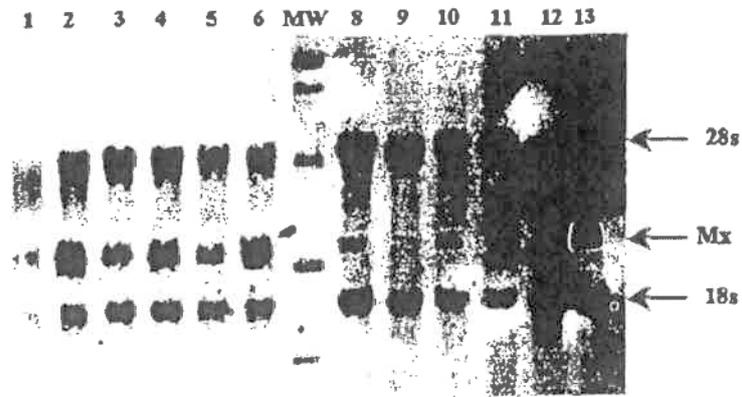


Figura 1

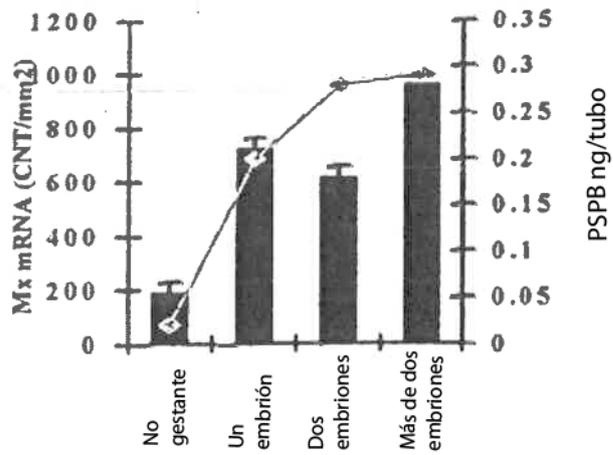


Figura 2

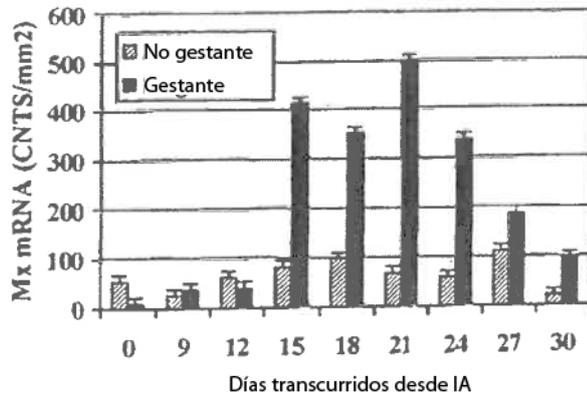


Figura 3

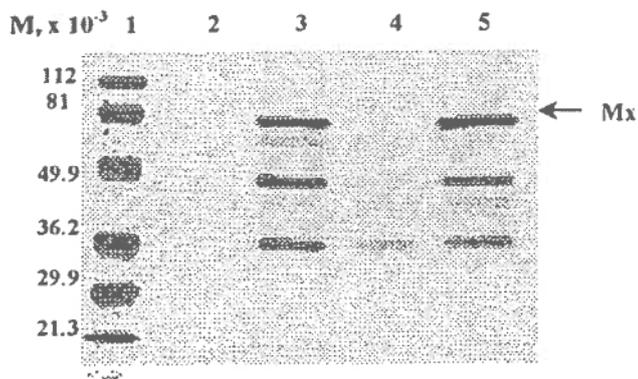


Figura 4