(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 629 829**

(51) Int. CI.:

G01N 33/564 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2012 PCT/US2012/036863**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12154705**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12782673 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2707717**

(54) Título: **Métodos para diagnosticar enfermedades degenerativas de las articulaciones**

(30) Prioridad:

10.05.2011 US 201161518707 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.08.2017

(73) Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH

(72) Inventor/es:

HANNAH, STEVEN SCOTT;
SHERRILL, SCOTT;
LI, QINGHONG y
SUN, PEICHUAN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para diagnosticar enfermedades degenerativas de las articulaciones

Comparación con solicitudes de patente relacionadas

Antecedentes de la presente invención

Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere en general a métodos para diagnosticar enfermedades y en particular a métodos para diagnosticar enfermedades degenerativas de las articulaciones.

Descripción del estado técnico correspondiente

Los métodos para diagnosticar problemas relacionados con las articulaciones son conocidos del estado técnico. La patente WO28049225A1 revela métodos para pronosticar osteoartritis, que consisten en determinar la localización celular de la proteína o complejo represor del factor transcripcional homeótico hipofisiario 1 (pitx-1), p.ej. prohibitina o prohibitona, en una muestra de p.ej. condrocitos articulares. La patente US20070248986A1 revela métodos para predecir la probabilidad de desarrollar artritis reumatoide en sujetos con artritis indiferenciada de aparición reciente, que consisten en determinar una serie de valores de parámetros clínicos y predecir el riesgo de desarrollar artritis reumatoide correlacionando los valores de dichos parámetros con valores de riesgo predefinidos correspondientes a intervalos de valores paramétricos, como p.ej. los niveles de proteína C reactiva en suero, los factores reumatoides, los anticuerpos anti-CCP, la edad, el género, la localización de las molestias articulares, la duración de la rigidez matutina y el número de articulaciones delicadas y/o hinchadas. La patente US7005274 revela métodos diagnósticos para la detección precoz del riesgo de desarrollar un trastorno artrítico en humanos y ensayos de identificación de agentes terapéuticos valiosos para el tratamiento de los trastornos artríticos, comparando los niveles de uno o más indicadores de la función mitocondrial alterada, p.ej. enzimas mitocondriales, factores de biosíntesis de ATP, masa mitocondrial, índice mitocondrial, contenido de ADN mitocondrial, respuestas celulares a niveles elevados de calcio intracelular y a los apoptógenos, y producción de radicales libres. La patente US20040242987A1 revela métodos para predecir las enfermedades óseas o articulares que afectan al sistema musculoesquelético (p.ej. osteoporosis), obteniendo parámetros micro y macroestructurales o biomecánicos de las imágenes de una articulación y analizando al menos dos de dichos parámetros, p.ej. parámetros macroanatómicos y biomecánicos. Otros métodos conocidos incluyen el examen físico, la radiografía simple, los escaneos por tomografía axial computada (TAC) y resonancia magnética (IRM), la radiografía de contraste y la artroscopia.

El diagnóstico de trastornos articulares, tales como las enfermedades degenerativas de las articulaciones, mediante examen físico y radiografía simple es corriente en los animales. Estos métodos son, en particular, las herramientas principales para diagnosticar osteoartritis en varios animales, como por ejemplo los perros. Sin embargo es frecuente que los animales afectados no manifiesten cojera u otros síntomas indicativos de enfermedad articular degenerativa. Desafortunadamente esto significa que los signos clínicos observables son insuficientes para ratificar un diagnóstico de enfermedad articular degenerativa, como p.ej. la osteoartritis. Por otra parte, la radiografía simple, aun siendo la técnica de examen usada con mayor frecuencia, revela cambios en los huesos, pero a menudo no muestra cambios en tejidos blandos como la cápsula de la articulación, lo cual complica el diagnóstico rutinario. Además los escaneos por TAC e IRM son caros y no siempre están a disposición. La radiografía de contraste y la artroscopia son en cierto grado invasivas. En algunos animales, por ejemplo en los perros, estas otras modalidades requieren alguna forma de inmovilización, como la anestesia, con el consabido coste, complejidad y riesgo. Frecuentemente la enfermedad articular degenerativa queda sin diagnosticar como consecuencia de las limitaciones de los métodos conocidos. Por lo tanto se necesitan nuevos métodos para diagnosticar las enfermedades degenerativas de las articulaciones en los animales.

Resumen de la presente invención

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es el de proporcionar métodos para diagnosticar enfermedades degenerativas de las articulaciones en los animales.

Este y otros objetivos se logran empleando métodos de diagnóstico de enfermedades articulares degenerativas en animales, que consisten en recoger muestras de saliva de un animal, determinar la cantidad de al menos un agente diagnóstico elegido del grupo constituido por interferón IFNγ, IP-10, IL-2 y TSP en la muestra de saliva, comparar la cantidad de agente diagnóstico encontrada en la saliva con una cantidad respectiva del mismo agente diagnóstico hallada en una muestra de saliva de uno o más animales de control semejantes que no sufran ninguna enfermedad articular degenerativa y diagnosticar que el animal es susceptible de padecer o que padece una enfermedad articular degenerativa, si la cantidad de agente diagnóstico en la muestra de saliva del animal es mayor que la cantidad del mismo agente diagnóstico hallada en la muestra de saliva procedente de uno o más animales de control semejantes.

Para el especialista en la materia serán evidentes otros objetivos, características y ventajas de la presente invención.

Descripción detallada de la presente invención

Definiciones

El término “animal” se refiere a cualquier animal susceptible de padecer, o que padece, una enfermedad articular degenerativa, incluyendo humanos, aves, bovinos, cánidos, equinos, felinos, caprinos, lupinos, múridos, ovinos o porcinos.

El término “animal de control semejante” se refiere a un animal de la misma especie y del mismo tipo o a un solo animal evaluado en dos momentos diferentes.

El término “articulación” significa una conexión entre dos o más partes adyacentes del esqueleto de un animal, ya sean huesos o cartílagos.

El término “enfermedad articular degenerativa” se refiere a una enfermedad o a otro estado causado por inflamación, descomposición o posible pérdida del cartílago de las articulaciones. La enfermedad articular degenerativa también se conoce como osteoartritis o artritis degenerativa.

El término “animales de compañía” se refiere a animales domesticados tales como perros, gatos, pájaros, conejos, cobayas, hurones, hámsters, ratones, jerbos, caballos de paseo, vacas, cabras, ovejas, asnos, cerdos y especies más exóticas mantenidas por las personas como compañía, diversión, apoyo psicológico, exhibicionismo y todas las demás actividades que las personas necesitan compartir con animales de otras especies.

Aquí los intervalos se indican de forma abreviada para evitar enumerar y describir cada valor incluido en ellos. Del intervalo se puede seleccionar cualquier valor apropiado, ya sea como valor superior, valor inferior o valor terminal del intervalo.

Tal como se usa aquí, la forma singular de una palabra incluye el plural y viceversa, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. Así, las referencias “un”, “una”, “el” y “la” incluyen generalmente los plurales de los términos respectivos. Así, por ejemplo, la referencia a “una articulación” o a “un método” comprende una pluralidad de tales “articulaciones” o “métodos”. Análogamente, las palabras “comprender”, “comprende” y “comprendiendo” se deben interpretar con un sentido más inclusivo que exclusivo. Los términos “incluir”, “incluyendo” y “o” deben interpretarse igualmente como inclusivos, a no ser que tal construcción sea claramente inadecuada por el contexto.

Los métodos y composiciones y otros avances revelados aquí no se limitan a metodologías, protocolos y reactivos particulares aquí descritos, porque pueden variar, tal como apreciará el especialista. Además, la terminología usada aquí solo tiene el propósito de describir formas de ejecución concretas y no pretende limitar ni limita el alcance de lo que está revelado o reivindicado.

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos científicos, técnicos y acrónimos empleados aquí tienen los significados comúnmente entendidos por un especialista en la materia perteneciente al campo o a los campos de la presente invención o de aquellos donde se usa el término. Aunque en la práctica de la presente invención puede usarse cualquier composición, método, artículo elaborado u otros medios o materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, en esta exposición se especifican las composiciones, métodos, artículos elaborados u otros medios o materiales preferidos.

Todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones, artículos técnicos y/o académicos y otras referencias aquí citadas o aludidas se incorporan en su totalidad a esta descripción como referencia en la medida permitida por la ley. La discusión de estas referencias solo pretende resumir las afirmaciones hechas ahí. No se reconoce que cualquiera de dichas patentes, solicitudes de patente, publicaciones o referencias, o cualquier parte de ellas, constituya material importante o estado técnico previo. Se reserva específicamente el derecho a cuestionar la exactitud y la pertinencia de cualquier afirmación de dichas patentes, solicitudes de patente, publicaciones y otras referencias como material importante o estado técnico previo.

La presente invención

En un aspecto la presente invención proporciona métodos para diagnosticar enfermedades articulares degenerativas en animales. Los métodos consisten en recoger saliva de un animal, determinar la cantidad de al menos un agente diagnóstico escogido del grupo constituido por interferón gamma (IFNγ), proteína-10 inducible por interferón (IP-10), interleucina-2 (IL-2) y proteínas totales en saliva (TSP) en la muestra de saliva, comparar la cantidad de agente diagnóstico hallada en la muestra de saliva con una cantidad correspondiente del mismo agente diagnóstico hallada en una muestra de saliva de uno o más animales de control semejantes que no sufran ninguna enfermedad articular degenerativa, y diagnosticar que el animal es susceptible de padecer o que padece una enfermedad articular degenerativa, si la cantidad de agente diagnóstico en la muestra de saliva del animal es mayor que la cantidad del mismo agente diagnóstico hallada en la muestra de saliva procedente de uno o más animales de control semejantes.

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los agentes diagnósticos de la presente invención se encuentran en la saliva de un animal y de que la cantidad de los agentes diagnósticos en la saliva sirve de indicador bioquímico para diagnosticar enfermedades degenerativas de las articulaciones, marcando o prediciendo el umbral de la enfermedad articular degenerativa. La presente invención permite realizar ensayos veterinarios y otros tipos de ensayos clínicos para analizar estos "biomarcadores" en la saliva y determinar si el animal es susceptible de padecer o padece una enfermedad articular degenerativa y si hay necesidad de más diagnósticos o de tratamiento. Una vez comprobada la necesidad de más diagnósticos o tratamientos, el coste y el riesgo de estos otros diagnósticos o tratamientos están justificados.

En varias formas de ejecución, uno o más animales de control semejantes (distintos de los animales examinados para ver si sufren una enfermedad articular degenerativa), que han sido encontrados libres de sufrir enfermedades articulares degenerativas, se analizan para determinar al menos uno de los agentes diagnósticos y los resultados de dichos análisis se emplean como valor de referencia para compararlo con los resultados de un animal sometido al análisis de uno o más agentes diagnósticos. En formas de ejecución preferidas, el valor de referencia de los agentes diagnósticos se determina evaluando numerosos animales de control semejantes.

En otra se determina la cantidad de al menos uno de los agentes diagnósticos en varios momentos a lo largo de la vida de un animal y los resultados se utilizan para determinar si el animal es susceptible de padecer o padece una enfermedad articular degenerativa, p.ej. si la cantidad de al menos un agente diagnóstico aumenta a medida que el animal envejece, se puede diagnosticar que el animal es susceptible de padecer o padece una enfermedad articular degenerativa. En formas de ejecución preferidas, el animal se valúa periódicamente y se registran los resultados de los agentes diagnósticos. Después, si una evaluación subsecuente indica que la cantidad de uno o más agentes diagnósticos ha aumentado desde el o los últimos análisis, se diagnostica que el animal es susceptible de padecer una enfermedad articular degenerativa o que la padece.

En una forma de ejecución se indica que el animal es susceptible de padecer una enfermedad articular degenerativa o que la padece, si la cantidad de IFNγ en la saliva del animal examinado es como mínimo 1,2 veces la cantidad de IFNγ hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes. En varias formas de ejecución la cantidad de IFNγ en el animal examinado es aproximadamente 1,2 hasta 20 veces la cantidad de IFNγ hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes.

En otra forma de ejecución se indica que el animal es susceptible de padecer una enfermedad articular degenerativa o que la padece, si la cantidad de IP-10 en la saliva del animal examinado es como mínimo 1,4 veces la cantidad de IP-10 hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes. En varias formas de ejecución la cantidad de IP-10 en el animal examinado es aproximadamente 1,4 hasta 20 veces la cantidad de IP-10 hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes.

En otra forma de ejecución se indica que el animal es susceptible de padecer una enfermedad articular degenerativa o que la padece, si la cantidad de IL-2 en la saliva del animal examinado es como mínimo 1,6 veces la cantidad de IL-2 hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes. En varias formas de ejecución la cantidad de IL-2 en el animal examinado es aproximadamente 1,6 hasta 20 veces la cantidad de IL-2 hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes.

En otra forma de ejecución se indica que el animal es susceptible de padecer una enfermedad articular degenerativa o que la padece, si la cantidad de TSP en la saliva del animal examinado es como mínimo 1,8 veces la cantidad de TSP hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes. En varias formas de ejecución la cantidad de TSP en el animal examinado es aproximadamente 1,8 hasta 20 veces la cantidad de TSP hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes.

Aunque el uso de uno de los agentes diagnósticos basta para diagnosticar una enfermedad articular degenerativa, la presente invención comprende el empleo de dos o más de dichos agentes diagnósticos y en muchas circunstancias puede ser preferible. En una forma de ejecución el diagnóstico está basado en dos agentes diagnósticos, según otra en tres agentes diagnósticos y según otra en los cuatro agentes diagnósticos. Los agentes diagnósticos se pueden evaluar y utilizar en cualquier combinación. En una forma de ejecución preferida el diagnóstico está basado en dos agentes diagnósticos, es decir en IFNγ y IP-10. En otra forma de ejecución preferida el diagnóstico está basado en los cuatro agentes diagnósticos.

Cualquier articulación susceptible de fallar se puede diagnosticar por los métodos de la presente invención. Como articulaciones típicas cabe citar, sin limitarse a ellas, articulaciones deslizantes (*Artrodia*), articulaciones trocleares (*Gínglimo*), articulaciones condíleas (*Condilartrosis*), articulaciones en silla de montar (*Articulaciones sellares*), articulaciones rotulianas (*Enartrosis*) y articulaciones pivotadas (*Trocoides*). Como articulaciones específicas cabe mencionar, sin limitarse a ellas, la articulación de la rodilla, del codo, las articulaciones interfalángicas, metacarpo-falángicas, la articulación de la muñeca, las articulaciones carpo-metacarpianas, la articulación del pulgar, del hombro, de la cadera, la articulación temporo-mandibular y las articulaciones radiocubitales. Las articulaciones del hombro y de la cadera son especialmente susceptibles de enfermedad degenerativa.

En varias formas de ejecución el animal es una persona o un animal de compañía. Preferentemente el animal de compañía es un cánido, como por ejemplo un perro, o un felino, como por ejemplo un gato.

Los métodos para recoger saliva de un animal son conocidos de los especialistas, p.ej. el uso de un juguete o de un dispositivo similar de interacción oral con el animal, como actividad lúdica, o sencillamente con un bastoncillo o un dispositivo similar para recoger una muestra de saliva. Un dispositivo de este tipo se revela en la solicitud de patente provisional US número 61/455152, titulada “Oral Engagement Assembly” [*Grupo de colocación oral*].

Los métodos para determinar la cantidad de los agentes diagnósticos en la saliva son bien conocidos en el estado técnico. Los especialistas disponen en el comercio de varios analizadores químicos, manuales o automáticos, para medir las concentraciones de los agentes diagnósticos de la presente invención en la saliva, p.ej. ensayos ELISA. En la sección de ejemplos de esta descripción se ofrecen algunos métodos como modelo.

Ejemplos

La presente invención se puede ilustrar con mayor detalle mediante los siguientes ejemplos, pero debe entenderse que estos ejemplos solo se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención, a no ser que se indique específicamente otra cosa.

Ejemplo 1

Recogida de saliva: se empleó un dispositivo comercial de recogida de saliva denominado Salivette® (SARSTEDT, Alemania) para recoger saliva de perros. Se abrió la boca al perro y se le insertó el bastoncillo de algodón Salivette® para que el animal lo masticara entre unos 30 y 45 segundos. Luego se le quitó el bastoncillo de algodón Salivette® y se colocó en el tubo de recogida Salivette®. La saliva se separó inmediatamente centrifugando el tubo a 1.000 g durante 2 minutos. Por último la muestra de saliva recogida en el fondo del tubo se transfirió a un microtubo nuevo y éste se congeló enseguida a -80ºC para su posterior análisis.

Análisis de citocinas caninas: se midieron 14 citocinas con el panel Luminex para ensayos multiplex de citocinas caninas, fabricado por Millipore, nº de catálogo CCYTO-90K. Se siguió el procedimiento normal del fabricante. Todas las muestras de saliva se centrifugaron a 14.000 g durante 2 minutos, junto antes del uso. Luego los sobrenadantes se pasaron cuidadosamente a un microtubo nuevo y se diluyeron 1 a 3 con tampón de ensayo Luminex (de Millipore, nº de catálogo L-AB). Las muestras individuales se aplicaron sobre una placa filtrante prehumectada de 96 pocillos (suministrada por el fabricante), con controles de calidad 1 & 2 (de Millipore, nº de catálogo LCC-6090) y patrones (de Millipore, nº de catálogo LCC-8090) de citocinas caninas. Las placas se procesaron de la manera indicada por el manual del fabricante. Las muestras de saliva se mezclaron con microesferas inmovilizadas con anticuerpos contra 14 citocinas/quimiocinas (GM-CSF, IFNγ, KC, IP-10, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18, MCP-1 y TNFα) y se incubaron por la noche 4ºC, removiendo fuertemente sobre un agitador de placas de valoración de laboratorio (de Lab-Line Instruments, modelo nº 4625). Al día siguiente se añadieron anticuerpos de detección de citocinas caninas (nº de catálogo LCC-1090) a la placa, después de lavarla con tampón de lavado Luminex (nº de catálogo L-WB). A continuación, la placa se selló y se incubó durante 1 hora a la temperatura ambiente, removiendo fuertemente sobre el agitador de placas. Después se agregó estreptavidina-ficoeritrina (nº de catálogo L-SAPE3) a la placa y se cubrió con una tapa (suministrada por el fabricante) para evitar la exposición a la luz. Luego la placa cubierta se incubó 30 minutos más, agitando fuertemente. Después de la incubación, la placa se lavó con tampón de lavado Luminex y las microesferas de los pocillos se resuspendieron en líquido laminar Luminex, y se leyó en un lector Luminex 100 IS. Las concentraciones de las citocinas en las muestra de saliva se calcularon mediante el programa llamado Luminex xPONENT (versión 3.1.871.0).

Sustancia P por ELISA: la saliva canina se analizó con un kit ELISA comercial - Parameter Substance P Assay (R&D Systems, nº de catálogo KGE 007). Para esta prueba, todas las muestras de saliva canina se diluyeron 20 veces en el Calibrator Diluent RD5-45 (incluido en el kit). Los patrones y los anticuerpos de detección (incluidos en el kit) se preparan en los mismos diluyentes indicados en el kit. Este ensayo ELISA es competitivo. Durante una incubación de 3 horas, la sustancia P (SP) en las muestras o en los patrones competirá con una cantidad fija de peroxisasa de rábano picante - sustancia P marcada (PRP-SP) para los sitios de unión en un anticuerpo murino anti-sustancia P. Transcurridas las 3 horas de incubación, la SP-PRP no unida/en exceso se eliminó por lavado, solo la SP y SP-PRP unidas pudieron unirse a la placa de 96 pocillos recubierta previamente con el anticuerpo (incluida en el kit) mediante la interacción entre el anticuerpo que recubre la placa y el anticuerpo murino anti-SP. Por último se añadió a la placa de 96 pocillos una solución de cromógeno (tetrametilbencidina). Solamente la SP-PRP unida, pero no la SP unida, reaccionaría con este substrato cromógeno para desarrollar un color azul. Después de parar la reacción con ácido sulfúrico 2 N se midió la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 450 nm con un lector de placas (Bio-TEK PowerWave X). La concentración de SP en una muestra es inversamente proporcional a la DO y se calculó usando un programa llamado KC Junior (versión 1.41), a partir de la curva estándar generada por una solución estándar de SP diluida en serie.

ELISA de IgA: la IgA en la saliva se analizó empleando un kit ELISA canino del comercio (Bethyl Laboratories, Inc., nº de catálogo E40-104). Todos los anticuerpos y patrones estaban incluidos en el kit. Se prepararon internamente

tampones corrientes de ELISA con productos químicos adquiridos a Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO) o comprados a otros vendedores, según lo establecido:

(1) Tampón de recubrimiento, carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6;
(2) Solución de lavado, Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, 0,05% de Tween 20, pH 8,0;
(3) Solución de bloqueo, Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, 1% de albúmina de suero bovino (ASB), pH 8,0;
(4) Diluyente de muestra/conjugado, Tris 50 mM, NaCl 0,14 M, 1% de ASB, 0,05% de Tween 20;
(4) Substrato enzimático TMB, solución preparada de SureBlue® (KPL, nº de catálogo 52-00-03); y
(5) Solución de parada, solución de ácido sulfúrico 4 N.

Se siguió el procedimiento ELISA sándwich normal. Se recubrió una placa ELISA de 96 pocillos con solución recién preparada de anticuerpo anti-IgA canina en tampón de recubrimiento y, transcurrida una hora, la placa se lavó con solución de lavado, se le añadió solución de bloqueo y se incubó durante 30 minutos. Tras los lavados se agregaron muestras prediluidas o soluciones estándar a los pocillos de la placa. La mayor parte de muestras de saliva se diluyó 1 a 5000 en diluyentes de muestra/conjugado y se efectuaron ajustes cuando las concentraciones medidas de IgA estaban fuera del rango dinámico de la curva estándar. Tras 1 hora de incubación y otra etapa de lavado se agregó solución de anticuerpo de detección conjugado con PRP (diluida en diluyente de muestra/conjugado) a la placa y se incubó durante una hora. Tras los lavados se inició el desarrollo colorimétrico de esta placa incorporando substrato enzimático TMB. Después de 10 a 15 minutos de desarrollo (hasta la aparición de colores azul oscuro correctos) se paró la reacción colorimétrica añadiendo solución de parada. Al final se midió la DO de esta placa con un lector de placas (Bio-TEK PowerWave X) a 450 nm. Las concentraciones de IgA en las muestras se calcularon utilizando un programa KC Junior (versión 1.41).

El contenido total de proteína en la saliva se midió mediante un kit comercial de ensayo de proteínas BCA (Thermo Scientific, nº de catálogo 23225) de la manera indicada en el manual. Se prepararon patrones de albúmina de suero bovino (ASB) por dilución en serie (en un intervalo de 0 hasta 2 mg/ml), en agua destilada y desionizada, de la ASB suministrada con el kit. Después, las muestras de saliva se diluyeron un número de veces adecuado para ajustar las concentraciones de proteína detectadas a la curva estándar de ASB. Puede costar varias veces encontrar la dilución correcta de las muestras individuales. A continuación se mezclaron bien, 50 a 1 (v/v), mediante agitación vortex, los reactivos A (Thermo Scientific, nº de catálogo 23221) y B (Thermo Scientific, nº de catálogo 23224) del ensayo de proteínas BCA en un tubo de ensayo nuevo de plástico. Luego se añadieron muestras diluidas o patrones de ASB a los pocillos de una placa de plástico de 96 pocillos con fondo transparente, seguidamente se agregó la mezcla de los reactivos A y B a estos pocillos y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. En el transcurso de la incubación, el sulfato de cobre pentahidrato contenido en el reactivo B reaccionó con proteína en las muestras; el Cu^{2+} fue reducido a Cu^{1+} y después el ácido bicinconínico (BCA) contenido en el reactivo A reacciona con el catión reducido (cuproso) formando una solución de color púrpura que presenta una fuerte absorbancia lineal a 562 nm con el incremento de las concentraciones de proteína. La placa con las muestras y los patrones se puede leer con un lector de placas (Bio-TEK PowerWave X) a una longitud de onda de 562 nm. Las concentraciones de proteína total en saliva se calcularon usando un programa KC Junior (versión 1.41).

Con todos los datos generados en este estudio se realizó una prueba t de Student usando un paquete informático de análisis “R” (www.r-project.org). Se investigaron las diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos para cada uno de los biomarcadores en la saliva. Los resultados figuran en las tablas 1 y 2. En ellas los datos demuestran que los contenidos de IFNγ, IP-10, IL-2 y proteína total en saliva son significativamente diferentes entre los animales con y sin enfermedad articular degenerativa. Por tanto estas sustancias sirven de biomarcadores de la enfermedad articular degenerativa en los animales.

Tabla 1

Animal ID	Sexo	Raza	Edad	Estado de salud	Índice BCS	Proteína total en saliva (mg/ml)	IgA en saliva (µg/ml)*
28	H/e	Bor Ter	14	EAD		15,63	5650,03
48	M/c	Pastor alemán	10	EAD	BCS 4	1,29	2003,24
30	M/c	LAB	14	EAD, demencia	BCS 6	0,87	372,41
31	M/c	LAB	10	EAD	BCS 7	0,57	493,85
32	H/e	LAB	10	EAD	BCS 5	1,07	1562,29
35	H/e	LAB	14	EAD	BCS 5	2,88	429,12
36	H/e	LAB	14	EAD	BCS 5	2,62	2774,87
37	H/e	LAB	13	EAD	BCS 5	1,49	2823,45
38	H/e	LAB	12	EAD	BCS 5	0,73	1642,76
46	H/e	LAB	14	EAD	BCS 6	1,79	2317,79
47	M/c	LAB	14	EAD	BCS 4	1,40	1694,37
29	H/e	SET	14	EAD, tumores mamarios	BCS 4	0,56	283,66
34	M/c	SET	14	EAD	BCS 5	0,89	541,31
39	H/e	SET	14	EAD	BCS 4	1,09	828,66
44	H/e	SET	8	Artritis	BCS 6	13,5	3297,19
33	H/e	SIB	6	EAD	BCS 5	2,78	2048,21
2B	H/e	SET	14	Control	BCS 5	1,78	533,45
3B	H/e	LAB	12	Control	BCS 5	1,56	336,50
4B	H/e	LAB	10	Control	BCS 5	1,42	1235,88
11B	H/e	LAB	2	Control	BCS 5	0,44	362,20
12B	H/e	LAB	2	Control	BCS 5	0,37	361,27
72	M/c	LAB	6	Control	BCS 5	0,74	724,12
81	M	LAB	7	Control	BCS 5	1,60	3839,68
53	M/c	LAB	9	Control	BCS 6	1,79	1183
57	H/e	LAB	10	Control	BCS 6	0,82	1652
64	H	LAB	6	Control	BCS 6	0,59	418
65	H	LAB	4	Control	BCS 6	0,58	474
72	M/c	LAB	6	Control	BCS 5	0,74	724
81	M	LAB	7	Control	BCS 5	1,60	3840
1B	H/e	LAB	14	Control	BCS 5	3,12	5844
15B	H/e	LAB	1	Control	BCS 5	2,89	895
8B	H/e	SET	4	Control	BCS 5	1,43	5295,47
17B	M/c	SET	14	Control	BCS 4	2,20	4815,07
19B	H/e	SET	13	Control	BCS 3	2,27	3005,73
68	M/c	SET	10	Control	BCS 5	0,74	284,30
73	M/c	SET	5	Control	BCS 5	3,12	10294,31
74	M/c	SET	4	Control	BCS 5	1,43	3575,66
78	M/c	SET	2	Control	BCS 5	1,14	2162,50

Tabla 1 (continuación)

GM-CSF (pg/ml)	IFNγ (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	IL-15 (pg/ml)	IL-18 (pg/ml)	IL-2 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)
39,02	4,4	1,6	106,65	16,47	38,33	28,8
199,84	4,4	39,41	25,95	42,12	6,4	28,8
49,95	26,24	1,6	31,11	7,15	36,58	28,8
25,34	98,48	1,6	36,46	14,38	27,61	28,8
29,91	3,55	1,6	19,04	2,28	12,81	28,8
48,13	42,18	16,22	53,42	14,36	53,59	28,8
41,76	4,4	1,6	32,31	21,03	15,68	28,8
22,16	4,4	1,6	24,56	8,44	14,09	28,8
85,11	147,40	3,92	72,94	99,14	162,01	86,88
14,4	4,4	31,11	14,8	38,75	6,4	28,8
14,4	4,4	22,70	14,8	16,33	6,4	28,8
36,27	23,27	1,6	50,51	11,00	28,73	28,8
39,08	4,4	1,6	14,8	7,13	15,91	28,8
41,05	10,16	0,19	38,53	27,98	50,80	28,8
14,4	4,4	4,84	27,58	12,45	6,4	28,8
60,41	8,88	1,6	Demasiado alto	23,31	39,67	28,8
18,775	60,395	1,6	14,8	5,805	37,98	28,8
56,855	103,23	2,03	77,77	14,575	48,575	28,8
51,75	100,045	1,31	47,59	9,97	47,735	28,8
93,365	89,745	19,855	52,815	49,675	68,045	138,93
54,49	66,52	19,5	20,18	29,39	76,17	138,93
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
29,84	14,40	1,55	46,18	17,72	69,72	106,09
29,45	47,23	1,60	11,56	10,58	22,43	28,8
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
52,00	56,50	1,60	14,80	14,20	76,18	28,8
19,71	25,74	4,55	30,19	4,60	25,96	12,37
22,955	37,665	1,6	14,8	4,69	19,335	28,8
97,14	125,91	10,34	113,41	21,84	157,59	28,8
54,43	4,4	1,6	52,26	9,30	72,57	28,8
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND

Tabla 1 (continuación)

IL-4 (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-7 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	KC (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	TNF-a (pg/ml)
28,8	12,1	9,43	20526,36	75,56	2906,47	185,41	53,05
28,8	67,93	25,88	5347,21	44,68	1516,46	86,42	49,60
28,8	12,1	11,73	3854,66	2,4	1054,65	82,13	21,93
28,8	12,1	25,26	4092,34	60,33	539,35	65,91	18,01
28,8	12,1	6,00	2408,24	2,4	1281,21	63,40	6,91
28,8	61,36	14,41	1578,69	120,57	1249,71	68,87	4,59
28,8	12,1	30,47	4251,10	95,79	620,63	56,54	13,29
28,8	12,1	12,30	6265,12	41,85	3034,49	71,32	39,44
86,88	12,1	37,00	3294,73	80,66	1833,44	124,43	8,28
28,8	49,12	34,76	4824,00	2,4	1654,22	69,52	25,10
28,8	26,13	14,21	5785,39	27,14	1277,45	47,76	10,18
28,8	12,1	8,17	4106,65	2,4	2184,59	69,21	4,13
28,8	12,1	13,66	2663,76	2,4	926,64	44,35	8,23
28,8	12,1	10,32	1573,32	129,12	551,25	68,35	12,96
28,8	18,80	9,05	13365,17	2,4	1755,42	299,53	346,56
28,8	12,1	17,38	3941,90	161,22	836,66	62,60	39,38
28,8	12,1	5,705	2008,645	2,4	1912,415	51,04	34,35
28,8	12,1	11,625	2369,905	2,4	1179,165	77,575	173,705
28,8	12,1	4,17	1639,415	2,4	2573,56	73,18	34,995
138,93	12,1	22,43	3994,99	2,4	1058,355	100,17	8,44
138,93	12,1	7,26	1211,25	2,4	322,87	60,69	4,97
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
106,09	12,10	22,45	3550,94	92,07	644,57	124,32	21,45
28,8	12,10	17,21	3475,75	2,4	870.09	76,38	0,40
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
28,8	12,10	26,21	3732,87	2,4	1155,56	100,86	294,79
12,37	33,00	4,60	469,39	80,25	292,56	31,76	0,40
28,8	12,1	4,6	2469,515	2,4	3129,81	58,605	13,845
28,8	12,1	63,79	21111,16	13,53	2679,59	101,79	96,33
28,8	12,1	12,72	2778,60	43,89	1015,67	96,20	9,80
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND
DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND	DND

DND = datos no disponibles

Tabla 2

Biomarcadores en saliva	Grupo de EAD		Grupo de control		valor p	Errores estándar
	Media	Nº de animales ensayados	Media	Nº de animales ensayados		
Proteína total en saliva	3,409	16	1,471	22	0,071*	0,525
Sustancia P	1307,357	16	728,5	14	0,571	498,575
IgA en saliva	2007,653	16	2357,097	22	0,639	356,161
GM-CSF	48,215	16	48,397	12	0,991	7,58
IFNγ	24,704	16	60,982	12	0,035**	8,706
IL-10	9,256	16	5,595	12	0,389	2,072
IL-15	37,065	16	41,363	12	0,712	5,646
IL-18	24,755	16	16,029	12	0,281	3,913
IL-2	32,579	16	60,191	12	0,087*	8,034
IL-4	32,949	16	52,227	12	0,157	6,731
IL-6	23,731	16	13,842	12	0,115	3,112
IL-7	18,581	16	16,898	12	0,755	2,612
IL-8	5708,381	16	4067,702	12	0,44	1033,569
IP-10	60,466	16	20,745	12	0,032**	9,418
KC	1427,386	16	1402,851	12	0,943	165,802
MCP-1	93,886	16	79,381	12	0,502	10,5
TNF-a	45,399	16	57,79	12	0,727	17,176
EAD = enfermedad articular degenerativa ** = significativo; * marginalmente significativo						

En la descripción se han revelado las formas de ejecuciones típicas, preferidas de la presente invención. Aunque se utilizan términos específicos, éstos están empleados solamente con sentido genérico y descriptivo, sin propósitos de limitación. El alcance de la presente invención está descrito en las reivindicaciones. Teniendo en cuenta lo expuesto es obvio que caben muchas modificaciones y variaciones de la presente invención. Por lo tanto debe entenderse que en el ámbito de las reivindicaciones adjuntas, la presente invención se puede llevar a la práctica de forma distinta a la que se ha descrito específicamente.

REIVINDICACIONES

1. Método para diagnosticar una enfermedad articular degenerativa en un animal, que consiste en:

determinar la cantidad de al menos un agente diagnóstico elegido del grupo constituido por IFNγ, IP-10, IL-2 y TSP en una muestra de saliva de un animal;
comparar la cantidad de agente diagnóstico encontrada en la saliva con una cantidad respectiva del mismo agente diagnóstico hallada en una muestra de saliva de uno o más animales de control semejantes que no sufren ninguna enfermedad articular degenerativa; y
diagnosticar que el animal es susceptible de padecer o que padece una enfermedad articular degenerativa, si la cantidad de agente diagnóstico en la muestra de saliva del animal es mayor que la cantidad del mismo agente diagnóstico hallada en la muestra de saliva procedente de uno o más animales de control semejantes.

2. El método de la reivindicación 1, en el cual el diagnóstico se basa en determinar la cantidad de al menos dos agentes diagnósticos.

3. El método de la reivindicación 2, en el cual los dos agentes diagnósticos son IFNγ e IP-10.

4. El método de la reivindicación 1, en el cual el diagnóstico se basa en determinar la cantidad de al menos tres agentes diagnósticos.

5. El método de la reivindicación 1, en el cual el diagnóstico se basa en determinar la cantidad de todos los cuatro agentes diagnósticos.

6. El método de la reivindicación 1, en el cual se diagnostica que el animal es susceptible de padecer o padece una enfermedad articular degenerativa, si la cantidad de IFNγ en la saliva es al menos 1,2 veces, si la cantidad de IP-10 en la saliva es al menos 1,4 veces, si la cantidad de IL-2 en la saliva es al menos 1,6 veces o si la cantidad de TSP en la saliva es al menos 1,8 veces la cantidad del mismo agente diagnóstico hallada en la muestra de saliva procedente de uno o más animales de control semejantes.

7. El método de la reivindicación 1, en el cual se diagnostica que el animal es susceptible de padecer o padece una enfermedad articular degenerativa, si la cantidad de IFNγ en la saliva es al menos 1,2 veces y si la cantidad de IP-10 en la saliva es al menos 1,4 veces la cantidad del mismo agente diagnóstico hallada en la muestra de saliva procedente de uno o más animales de control semejantes.

8. El método de la reivindicación 1, en el cual se diagnostica que el animal es susceptible de padecer o padece una enfermedad articular degenerativa, si la cantidad de IFNγ en la saliva es al menos 1,2 veces, si la cantidad de IP-10 en la saliva es al menos 1,4 veces, si la cantidad de IL-2 en la saliva es al menos 1,6 veces y si la cantidad de TSP en la saliva es al menos 1,8 veces la cantidad del mismo agente diagnóstico hallada en la muestra de saliva procedente de uno o más animales de control semejantes.

9. El método de la reivindicación 1, en el cual la articulación es de tipo deslizante, troclear, condíleo, en forma de silla de montar, rotuliano o pivotado.

10. El método de la reivindicación 1, en el cual la articulación es de rodilla, de codo, interfalángica, metacarpo-falángica, de muñeca, carpo-metacarpiana, del pulgar, del hombro, de cadera, temporo-mandibular o radiocubital.

11. El método de la reivindicación 1, en el cual la articulación es de hombro.

12. El método de la reivindicación 1, en el cual la articulación es de cadera.

13. El método de la reivindicación 1, en el cual el animal es un humano.

14. El método de la reivindicación 1, en el cual el animal es un animal de compañía.

15. El método de la reivindicación 14, en el cual el animal es un cánido.

16. El método de la reivindicación 16, en el cual el animal es un perro.

17. El método de la reivindicación 14, en el cual el animal es un felino.

18. El método de la reivindicación 17, en el cual el animal es un gato.

19. Método para diagnosticar una enfermedad articular degenerativa en un animal, que consiste en:

determinar la cantidad de al menos un agente diagnóstico elegido del grupo constituido por IFNγ, IP-10, IL-2 y TSP en una muestra de saliva de un animal; y
comparar la cantidad de agente diagnóstico encontrada en la saliva con una cantidad respectiva del mismo agente diagnóstico hallada en una muestra de saliva de uno o más animales de control semejantes que no sufren ninguna enfermedad articular degenerativa; y
diagnosticar que el animal es susceptible de padecer o que padece una enfermedad articular degenerativa, si la cantidad de IFNγ en la saliva del animal examinado es como mínimo 1,2 veces la cantidad de IFNγ hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes, si la cantidad de IP-10 en la saliva del animal examinado es como mínimo 1,4 veces la cantidad de IP-10 hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes, si la cantidad de IL-2 en la saliva del animal examinado es como mínimo 1,6 veces la cantidad de IL-2 hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes o si la cantidad de TSP en la saliva del animal examinado es como mínimo 1,8 veces la cantidad de TSP hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes.

20. Método para diagnosticar una enfermedad articular degenerativa en un animal, que consiste en:

determinar la cantidad de al menos un agente diagnóstico elegido del grupo constituido por IFNγ, IP-10, IL-2 y TSP en una muestra de saliva de un animal; y
comparar la cantidad de agente diagnóstico encontrada en la saliva con una cantidad respectiva del mismo agente diagnóstico hallada en una muestra de saliva de uno o más animales de control semejantes que no sufren ninguna enfermedad articular degenerativa; y
diagnosticar que el animal es susceptible de padecer o que padece una enfermedad articular degenerativa, si la cantidad de IFNγ en la saliva del animal examinado es aproximadamente 1,2 hasta 20 veces la cantidad de IFNγ hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes, si la cantidad de IP-10 en la saliva del animal examinado es aproximadamente 1,4 hasta 20 veces la cantidad de IP-10 hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes, si la cantidad de IL-2 en la saliva del animal examinado es aproximadamente 1,6 hasta 20 veces la cantidad de IL-2 hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes o si la cantidad de TSP en la saliva del animal examinado es aproximadamente 1,8 hasta 20 veces la cantidad de TSP hallada en la saliva de uno o más animales de control semejantes.