

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 684**

21 Número de solicitud: 201630755

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**06.06.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**07.12.2017**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (83.3%)  
Avenida Medina Azahara, 5  
14071 CORDOBA (Córdoba) ES y  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (16.7%)**

72 Inventor/es:

**DEMYDA PEYRAS, Sebastian;  
MORENO MILLÁN, Miguel;  
ANAYA CALVO-RUBIO, Gabriel;  
MOLINA ALCALÁ, Antonio;  
MEMBRILLO DEL POZO, Alberto y  
VALERA CÓRDOBA, Mercedes**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

54 Título: **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA INFERTILIDAD EQUINA**

57 Resumen:

Método para el diagnóstico precoz de la infertilidad equina.

La presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de infertilidad equina de origen genético mediante la detección de los marcadores ECAX: LEX026, TKY38, TKY270, LEX003, UCDEQ502, y los marcadores ECAY: Eca.YH12 y SRY. Al uso de dichos marcadores ECAX y ECAY para el diagnóstico de la infertilidad equina de origen genético.

## DESCRIPCIÓN

Método para el diagnóstico precoz de la infertilidad equina.

### Campo de la invención

5 La presente invención se encuadra en el campo general en el área de la medicina veterinaria equina y en particular, se refiere a un método para el diagnóstico precoz de la infertilidad equina.

### Estado de la técnica

10 El impacto económico del Sector Ecuestre en España es muy importante, generando un volumen de 5.303,6 millones de € que representa el 0,51% del PIB del país. Está representado por 723.496 animales que se distribuyen en 175.429 explotaciones, lo que generan más de 61.000 empleados. Más del 25% de estos caballos son de Pura Raza Española (PRE), siendo esta raza la más importante de toda la Península Ibérica, e incluso una de las más importantes a nivel mundial. El censo actual de la raza incluye 182.509 animales (55.853 yeguas reproductoras y 33.391 sementales) distribuidos en 22.843 ganaderías en España a los que hay que sumar los 41.025 individuos (13.118 hembras y 8.917 machos reproductores) que se encuentran en las 8.054 explotaciones distribuidas a lo largo de 60 países (Gómez, Valera et al. 2009. "Assessment of inbreeding depression for body measurements in Spanish Purebred (Andalusian) horses." Livest Sci **122**(2-3): 149-155). Su relevancia supera ampliamente el interés productivo, ya que además estos animales son reconocidos en todo el mundo como un símbolo de la cultura y las tradiciones Españolas.

La gestión del libro genealógico y el plan de mejora de esta raza están a cargo de la Asociación Nacional de Criadores de Caballos de Pura Raza Española (ANCCE), tanto en la Península Ibérica como en el resto del mundo.

25 Dentro del sector, la compra y venta de ejemplares así como de cubriciones para reproducción y cría generan un considerable volumen económico. De ahí la importancia de utilizar animales que no presenten ningún tipo de impedimento o tara reproductiva ya sea innata, de tipo genético, o adquirida, derivada de problemas médicos.

30 Las infertilidades de tipo congénito están provocadas por diversas causas. Este tipo de alteraciones suelen pasar desapercibidas en los animales debido a que la mayoría de los animales no desarrolla una sintomatología externa apreciable hasta que alcanzan la madurez sexual, momento en el que comienzan a manifestar problemas reproductivos. En

los machos se aprecian comportamientos anómalos y falta de libido mientras que en las hembras surgen dificultades a la hora de quedar gestantes llegando incluso a producirse la no presencia de ciclos sexuales regulares durante su temporada reproductiva.

5 Dentro de las enfermedades de origen genético son las alteraciones cromosómicas, caracterizadas por la variación en el número o en la estructura física en alguno de los 64 cromosomas presentes en la especie equina, las que representan el mayor porcentaje de la casuística. Este tipo de patologías están muy poco estudiadas en esta especie debido principalmente a la extrema dificultad que presenta su cariotipo como consecuencia de la similitud existente entre muchos de sus cromosomas (Bugno, Słota et al. 2009.

10 "Identification of chromosome abnormalities in the horse using a panel of chromosome-specific painting probes generated by microdissection." *Acta Vet Hung* **57**(3): 369-381). Se ha determinado que la mayoría de los casos de caballos que presentan alteraciones cromosómicas demuestran una infertilidad asociada, generalmente debido a desórdenes ligados al desarrollo sexual (DSD). Dentro las alteraciones cromosómicas en caballos, el

15 síndrome de Turner y el síndrome de sexo reverso son las patologías más comunes con más del 70% de la casuística registrada hasta la fecha (*Lear, T. L. and R. B. McGee (2012). "Disorders of sexual development in the domestic horse, Equus caballus." Sexual Development* 6(1-3): 61-71).

20 En el síndrome de Turner, descrito por primera vez en los seres humanos en los años 50, se observa la ausencia de un cromosoma sexual, siendo normales los 62 cromosomas autosómicos, resultando en complemento cromosómico impar (monosomía en el par sexual;  $2n=63,X0$ ). Los animales portadores de esta patología presentan una apariencia externa normal, una leve disgenesia gonadal y por consiguiente, una esterilidad en la mayoría de los casos.

25 Por otro lado, existen animales que muestran un fenotipo y comportamiento sexual contrapuesto al que deberían tener de acuerdo a su dotación cromosómica, conocido como síndrome de sexo reverso. Inicialmente, esta patología se presentaba en sólo dos casuísticas bien diferenciadas: animales fenotípicamente machos con una dotación cromosómica de hembra ( $2n=64, XX$ ), o bien animales cuyo fenotipo coincidía con el de una

30 hembra pero que contaban con una dotación cromosómica de macho ( $2n=64, XY$ ). Sin embargo, existe una región dentro del genoma de los mamíferos superiores que codifica un gen relacionado con el inicio de la diferenciación sexual fetal (SRY, sex determining región), altamente involucrada en los casos de sexo reverso (Sinclair, Berta et al. (1990). "A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved

35 DNA-binding motif." *Nature* **346**(6281): 240-244). A partir de ello fue posible ampliar la

clasificación de este tipo de patologías detectándose cuatro posibles presentaciones: machos 64, XX, SRY positivo; machos 64, XX, SRY negativo y yeguas 64, XY SRY positivo o negativo. Las hembras 64, XY, SRY negativo es el caso más común entre los equinos (Lear, T. L. and R. B. McGee (2012). "Disorders of sexual development in the domestic horse, *Equus caballus*." *Sexual Development* 6(1-3): 61-71). Los animales que presentan sexo reverso suelen mostrar una apariencia externa normal y en ocasiones una leve disgenesia gonadal.

Otra de las patologías derivadas de las anomalías cromosómicas más comúnmente observadas en los animales de producción es el quimerismo celular. Esta patología se produce debido al intercambio de tejidos sanguíneos y de hormonas a través de la circulación placentaria entre hermanos mellizos dicigóticos durante las gestaciones gemelares (Mishra, Arora et al. 2009. "Studies on effect of Booroola (FecB) genotype on lifetime ewes' productivity efficiency, litter size and number of weaned lambs in Garole x Malpura sheep." *Anim Reprod Sci* **113**(1-4): 293-298). Se trata de una alteración muy extraña en los caballos debido a que la gestación gemelar en caballos termina en un altísimo porcentaje en abortos. Sin embargo, en el caso que suceda, su presentación en los caballos suele ser también asintomática hasta edades avanzadas (Padula, A. M. (2005). "The freemartin syndrome: An update." *Animal Reproduction Science* 87(1-2): 93-109.)

Este tipo de alteraciones, han sido diagnosticadas históricamente mediante técnicas citogenéticas de cariotipado. Las mismas requieren un cultivo de células sanguíneas, que se detienen en el estadio de metafase (fase de división celular en la que la célula ha organizado su ADN en cromosomas) y su posterior tratamiento con técnicas de bandedo para identificar de manera específica cada uno de los cromosomas presentes o ausentes (). Estas técnicas de cariotipado presentan en el caballo una elevada dificultad debido a la existencia de una gran cantidad de cromosomas de similar forma y tamaño pequeño que dificultan su correcta identificación y pueden ser fácilmente confundidos entre los que se encuentra el cromosoma Y (ECAY) (Bowling, Breen et al. 1997. "Report of the Third International Committee for the standardization of the domestic horse Karyotype, Davis, CA, USA, 1996. International system for cytogenetic nomenclature of the domestic horse." *Chromosome Research* **5**(7): 433-443).

Posteriormente se han desarrollado técnicas de citogenética molecular basadas en la hibridación fluorescente *in situ* (FISH). En ellas se utilizan sondas de ADN para determinar de manera específica la presencia o ausencia de un cromosoma, o inclusive una parte de los mismos. Sin embargo este tipo de técnicas no están desarrolladas de manera comercial en los equinos, y presentan una serie de desventajas como son la falta de sondas

específicas para cada uno de los 33 cromosomas de la especie, el elevado coste de cada determinación, la elevada inversión de tiempo necesario para analizar cada muestra, etc. Debido a todos estos factores, estas técnicas se desarrollan en muy pocos laboratorios a nivel mundial (Villagómez, Lear et al. 2011. "Equine disorders of sexual development in 17 mares including XX, SRY-negative, XY, SRY-negative and XY, SRY-positive genotypes." Sex Dev **5**(1): 16-25).

Estos inconvenientes técnicos, unidos al hecho de que la mayoría de los caballos que presentan alteraciones cromosómicas no demuestran cambios fenotípicos o en su comportamiento hace que el número de individuos que permanecen sin diagnosticar es probablemente muy elevado y por lo tanto, la prevalencia real de animales portadores de aberraciones cromosómicas permanecen gran medida subestimada (Lear and Bailey 2008. Lear, T. L. and E. Bailey (2008). "Equine clinical cytogenetics: The past and future." Cytogenet Genome Res **120**(1-2): 42-49).

Nuestro desarrollo se basa en la utilización de marcadores moleculares específicos de tipo Microsatélite o STR (del inglés, "Short Tandem Repeats") para la determinación de las anomalías antes descritas. Estos marcadores son ampliamente utilizados en diversas áreas científicas y han demostrado un alto porcentaje de fiabilidad en aplicaciones de tipo forense, legal y productivo, siendo los más utilizados en las investigaciones de caracterización genética y molecular.

En la actualidad, este tipo de marcadores son los de elección para la realización de test de paternidad o de identificación de muestras de ADN. Sin embargo, los marcadores utilizados rutinariamente (Dimsoski 2003. "Development of a 17-plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses." Croatian Medical Journal **44**(3): 332-335) no cumplen con las condiciones necesarias para poder determinar anomalías cromosómicas debido a su falta de cobertura en los cromosomas ECAX (cromosoma X de caballo) e ECAY (cromosoma Y del caballo).

Existe pues la necesidad de proporcionar un procedimiento para la detección de problemas reproductivos en caballos, de manera precoz, rápida, fiable y con alta sensibilidad y especificidad.

### **Breve descripción de la invención**

La presente invención soluciona los problemas anteriormente descritos ya que proporciona un sistema de diagnóstico molecular que permite la detección de alteraciones cromosómicas relacionadas con problemas reproductivos en equinos. El método de la presente invención

tiene la ventaja de ser un método rápido y fiable puesto que presenta un 100% de sensibilidad (probabilidad de dar como positivo a un individuo afectado) y un 99,75% de especificidad (probabilidad de dar como negativo a un individuo no afectado) por lo que todo animal con alteración será dado como positivo y solo un 0,25% de animales sanos pueden ser diagnosticados como falsos positivos.

Así pues, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de infertilidad equina de origen genético (de aquí en adelante, método de la presente invención) que comprende las siguientes etapas:

a) detectar, en una muestra obtenida de un animal, los marcadores ECAX: *LEX026*, *TKY38*, *TKY270*, *LEX003*, *UCDEQ502*, y los marcadores ECAY: *Eca.YH12* y *SRY*,

b) obtener el genotipo de dicha muestra aislada en base a la homocigosis, heterocigosis de los marcadores ECAX, y la presencia o ausencia de los marcadores ECAY detectados en la etapa a), donde:

- la detección de amplificación de al menos un alelo en al menos un marcador ECAX es indicativo de la presencia de al menos un cromosoma X y la heterocigosis de al menos un marcador ECAX es indicativo de la presencia de al menos dos cromosomas X,

y donde

- la presencia de amplificación en el marcador *Eca.YH12* es indicativo de la presencia de al menos un cromosoma Y, y donde la presencia de amplificación en el marcador *SRY* es indicativo de la presencia del gen responsable del inicio de la cadena de diferenciación sexual masculina. En una realización en particular, la muestra aislada del animal incluye cualquier tipo de muestra aislada del animal que contenga ADN, preferentemente la muestra aislada incluye pero no se limita a sangre, saliva, o un folículo piloso.

En una realización en particular de la presente invención, la detección de los marcadores de la etapa a) se realiza mediante amplificación. Más preferentemente la amplificación es una amplificación simultánea. Preferentemente la amplificación se realiza mediante PCR multiplex.

Infertilidad de origen genético incluye pero no se limita a infertilidad originada por el síndrome de Turner, quimerismo y síndrome del sexo reverso.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de los marcadores *LEX026*, *TKY38*, *TKY270*, *LEX003*, *UCDEQ502*, *Eca.YH12* y *SRY* (marcadores de la presente invención) para el diagnóstico de infertilidad equina de origen genético.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit para el diagnóstico de infertilidad equina de origen genético (de aquí en adelante kit de la presente invención) según el método de la presente invención que comprende las sondas y cebadores necesarios para detectar los marcadores *LEX026*, *TKY38*, *TKY270*, *LEX003*, *UCDEQ502*,  
 5 *Eca.YH12* y *SRY*. En una realización en particular, el kit comprende las sondas y cebadores identificados como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 14.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit de la presente invención para el diagnóstico de la infertilidad equina de origen genético.

### **Descripción detallada de la invención**

10 El método de la presente invención permite la detección de infertilidad equina de origen genético mediante el análisis probabilístico de los resultados obtenidos de un panel de microsatélites específicamente desarrollados, testeados y ajustados para su utilización en el caballo PRE. El mismo ofrece una serie de combinaciones basadas en la presencia o  
 15 ausencia de amplificación en cada uno de los marcadores así como las distintas combinaciones alélicas posibles. Por un lado, la amplificación de microsatélites del cromosoma X indica la presencia de al menos un cromosoma X mientras que la amplificación de algún marcador del cromosoma Y indica la presencia de un cromosoma Y. Por otro lado, la presencia de al menos un marcador del cromosoma X en heterocigosis, nos indica que existen al menos dos cromosomas X diferentes. En primera instancia, mediante  
 20 el uso de los marcadores microsatélites, este método permite identificar, en función de las combinaciones posibles y del fenotipo del animal entre machos normales (XY), hembras normales (XX), síndrome de Turner (X0), síndrome de quimerismo celular (XX/XY) y síndrome sexo reverso (Machos, XX y Hembras XY). A su vez, la presencia o ausencia del fragmento *SRY* permite la clasificación de los animales con síndrome de sexo reverso en:  
 25 Machos XX, *SRY* positivo; Machos XX, *SRY* negativo; Hembras XY, *SRY* negativo; Hembras XY, *SRY* positivo.

En la tabla 1 se presentan los marcadores utilizados en la reacción, el tamaño de segmento genómico esperado, los cebadores utilizados, el tipo de marcaje fluorescente empleado en cada uno de ellos y su localización física en los distintos cromosomas sexuales del equino.

| <b>Marcador</b> | <b>Tamaño</b> | <b>Cebadores</b>                                             | <b>Localización<br/>en el<br/>cromosoma</b> |
|-----------------|---------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| LEX026          | 300-314       | SEQ ID NO: 1 (marcado con fluorocromo FAM)<br>SEQ ID NO: 2   | Xp                                          |
| TKY38           | 105-131       | SEQ ID NO: 3 (marcado con fluorocromo FAM)<br>SEQ ID NO: 4   | Xq23                                        |
| TKY270          | 154-172       | SEQ ID NO: 5 (marcado con fluorocromo HEX)<br>SEQ ID NO: 6   | X                                           |
| LEX003          | 194-214       | SEQ ID NO: 7 (marcado con fluorocromo FAM)<br>SEQ ID NO: 8   | Xq                                          |
| UCDEQ502        | 164-176       | SEQ ID NO: 9 (marcado con fluorocromo FAM)<br>SEQ ID NO: 10  | Xp                                          |
| Eca.YH12        | 98            | SEQ ID NO: 11 (marcado con fluorocromo FAM)<br>SEQ ID NO: 12 | Y                                           |
| SRY             | 249           | SEQ ID NO: 13 (marcado con fluorocromo HEX)<br>SEQ ID NO: 14 | Yq13                                        |

Tabla 1: marcadores utilizados en la presente invención

5 Todas las parejas de cebadores de los distintos marcadores se incluyeron en una sola  
 reacción de PCR multiplexada. La reacción se realizó en un volumen total de 25 µl de  
 mezcla de reacción conteniendo de 20-60 ng de ADN genómico, 1.5-7.5 pmol de cada  
 pareja de cebadores, 0.33 mmol/L de dNTPs, 2.5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, tampón de reacción a  
 una concentración de 1X, y 1.5 unidades de Taq Polimerasa. Al tubo de reacción se le aplicó  
 10 un protocolo térmico que consistió en un paso de desnaturalización inicial de 95 °C durante  
 10 minutos, 33 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 1 minuto, y 72 °C  
 durante 30 segundos. Finalmente se realizó una elongación de 72 °C durante 10 minutos. La  
 resolución de los productos amplificados se realizó mediante la secuenciación mediante

electroforesis capilar. El análisis de los fragmentos resultantes para determinar el tamaño de los alelos se realizó mediante un software específico utilizando un estándar de tamaño LIZ 500 bp.

En base a la amplificación o no de los marcadores se determinó la presencia o ausencia del ECAX y del ECAY. A su vez, la amplificación de marcadores del ECAX en heterocigosis u homocigosis determinó la presencia de uno o dos cromosomas X en un mismo individuo. También se puede conocer la presencia o no del gen SRY de diferenciación sexual masculina. En la tabla 2 se detallan todas las combinaciones posibles y el diagnóstico según nuestro test.

| FENOTIPO | GENOTIPO                      |                 |     |                         |
|----------|-------------------------------|-----------------|-----|-------------------------|
|          | Microsatélites ECAX           | Fragmentos ECAY |     | DIAGNOSTICO             |
|          |                               | YH12            | SRY |                         |
| Macho    | Todos en homocigosis          | +               | +   | Macho normal (XY)       |
| Hembra   | Al menos uno en heterocigosis | -               | -   | Hembra normal (XX)*     |
| Hembra   | Todos en homocigosis          | -               | -   | Síndrome de Tumer (X0)  |
| Macho    | Al menos uno en heterocigosis | +               | +   | Quimerismo Macho**      |
| Hembra   | Al menos uno en heterocigosis | +               | +   | Quimerismo Hembra**     |
| Macho    | Al menos uno en heterocigosis | -               | +   | Macho SRY positivo DSD  |
| Macho    | Al menos uno en heterocigosis | -               | -   | Macho SRY negativo DSD  |
| Hembra   | Todos en homocigosis          | +               | +   | Hembra SRY positivo DSD |
| Hembra   | Todos en homocigosis          | +               | -   | Hembra SRY negativo DSD |

Tabla 2: resultados obtenidos en el test realizado

\* Este resultado tiene un 99,75% de especificidad.

\*\* En caso de haber diferencias entre los resultados obtenidos en muestras de sangre y de pelo el quimerismo será de tipo hematopoyético, es decir sanguíneo solamente.

Este sistema diagnóstico se validó sobre muestras de Caballo Pura Raza Español (PRE) para determinar el nivel de Sensibilidad y Especificidad. Para ello se calcularon las frecuencias alélicas y el nivel de heterocigosidad de cada uno de los marcadores del ECAX. Esto permitió detectar la probabilidad de que en una hembra normal, los resultados demostraran la presencia de al menos un marcador del cromosoma X en heterocigosis indicándonos la presencia de dos cromosomas X. De esta manera, el nivel de Especificidad de esta técnica se determinó en un 99,75% por lo que solamente el 0,25 de hembras sanas serían diagnosticadas como falsos positivos. Por otro lado, la técnica posee un 100% de

sensibilidad puesto que cualquier alteración relacionada con los marcadores sexuales será determinada en todos los individuos afectados.

#### Ejemplo 1: método de diagnóstico de infertilidad

5 Se recibieron muestras de dos yeguas PRE remitidas por el veterinario experto debido a la falta de suceso reproductivo en más de dos temporadas.

El primer caso se trataba de una yegua PRE de 4 años con sintomatología de infertilidad sin causa aparente. El segundo caso se trataba de un ejemplar de 3 años que no había mostrado celo en su primera campaña reproductiva.

10 En el día de la recepción se llevo a cabo la extracción de ADN de muestras de sangre de ambos animales y la reacción de PCR, enviándose una vez finalizada al servicio de secuenciación de la Universidad de Córdoba. El día siguiente se recibieron los resultados secuenciados y se procedió a su análisis.

Los resultados de los marcadores fueron los siguientes:

| FENOTIPO | GENOTIPO                   |        |        |       |          |            |             |                         |
|----------|----------------------------|--------|--------|-------|----------|------------|-------------|-------------------------|
|          | Microsatélites cromosoma X |        |        |       |          | Fragmentos | Cromosoma Y | DIAGNOSTICO             |
|          | LEX003                     | LEX026 | TKY270 | TKY38 | UCDEQ502 | YH12       | SRY         |                         |
| Yegua    | 206                        | 314    | 168    | 109   | 176      | +          | -           | Hembra SRY negativo SDS |
| Yegua    | 204                        | 298    | 12     | 127   | 166      | +          | -           | Hembra SRY negativo SDS |

15 De acuerdo al análisis de los datos y a la presencia de un cromosoma ECAX y un cromosoma ECAY y la ausencia del gen SRY en cada uno de los animales se determino que se trataba de casos 64, XY sexo reverso de tipo SRY negativo con un 100% de certeza. Es de hacer notar que el resultado se obtuvo en 24hs, lo cual es imposible mediante la utilización de otras metodologías diagnosticas.

## REINVINDICACIONES

1. Método in vitro para el diagnóstico de infertilidad equina de origen genético que comprende las siguientes etapas:
  - a) detectar, en una muestra obtenida de un animal, los marcadores ECAX: *LEX026*, *TKY38*,  
5 *TKY270*, *LEX003*, *UCDEQ502*, y los marcadores ECAY: *Eca.YH12* y *SRY*,
  - b) obtener el genotipo de dicha muestra aislada en base a la homocigosis, heterocigosis de los marcadores ECAX, y la presencia o ausencia de los marcadores ECAY detectados en la etapa a), donde:
    - la detección de amplificación de al menos un alelo en al menos un marcador ECAX es  
10 indicativo de la presencia de al menos un cromosoma X y la heterocigosis de al menos un marcador ECAX es indicativo de la presencia de al menos dos cromosomas X,  
y donde
    - la presencia de amplificación en el marcador *EcaYH12* es indicativo de la presencia de al menos un cromosoma Y, y donde la presencia de amplificación en el marcador *SRY* es  
15 indicativo de la presencia del gen responsable del inicio de la cadena de diferenciación sexual masculina.
2. Método según la reivindicación 1, donde la muestra del animal es sangre, saliva, o un folículo piloso.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la detección de los  
20 marcadores de la etapa a) se realiza mediante amplificación.
4. Método según la reivindicación 3, donde la amplificación es una amplificación simultánea.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la infertilidad de origen genético es seleccionada de entre síndrome de Turner, quimerismo y síndrome del sexo reverso.
- 25 6. Uso de los marcadores *LEX026*, *TKY38*, *TKY270*, *LEX003*, *UCDEQ502*, *Eca.YH12* y *SRY*, para el diagnóstico de infertilidad equina de origen genético.
7. Kit para el diagnóstico de infertilidad equina de origen genético según el método de las reivindicaciones 1-5 que comprende las sondas y cebadores necesarios para detectar los marcadores *LEX026*, *TKY38*, *TKY270*, *LEX003*, *UCDEQ502*, *Eca.YH12* y *SRY*.

8. Kit según la reivindicación 7, que comprende las sondas y cebadores identificados como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 14.

9. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 6-7 para el diagnóstico de la infertilidad equina de origen genético.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA; UNIVERSIDAD DE SEVILLA

5 <120> MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LA INFERTILIDAD EQUINA

<130> PT2016/0004

<160> 14

10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

15 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LEXO26, CEBADOR F

20

<400> 1

tccagagtga atggcaaadc c

21

25 <210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> CEBADOR LEX026 R

<400> 2

ggattaaggg gagaaaatat ctg

24

10

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> CEBADOR TKY38 F

20 <400> 3

taagtattct cataaacggg

20



- ②① N.º solicitud: 201630755  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2016  
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 |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| X         | KAKOI H et al. "Genetic diagnosis of sex chromosome aberrations in horses based on parentage test by microsatellite DNA and analysis of x- and y-linked markers". Equine veterinary journal (2005). Vol.37, Nº 2, Páginas 143 – 147. Todo el documento, en particular tabla1.                                                                 | 1-9                        |
| Y         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 1-9                        |
| Y         | DEMYDA-PEYRAS et al. "The use of a novel combination of diagnostic molecular and cytogenetic approaches in horses with sexual karyotype abnormalities: a rare case with an abnormal cellular chimerism." Theriogenology (2014), Vol. 81, Nº 8, Páginas 1116 – 1122. Todo el documento, en particular punto 2.5 pág. 1118; tabla 2, pág. 1121. | 1-9                        |

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  
26.10.2017

Examinador  
M. Hernández Cuéllar

Página  
1/6



- ②① N.º solicitud: 201630755  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2016  
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 |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A         | VILLAGOMEZ D A F et al. "Equine disorders of sexual development in 17 mares including XX, SRY-negative, XY, SRY-negative and XY, SRY-positive genotypes." Sexual Development (2011), Vol. 5, Nº 1, Páginas 16-25. Todo el documento.                                                                           | 1-9                        |
| A         | GIESECKE KATRIN et al., "infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: a review".Veterinary journal (2010). Vol. 185, Nº 3, Páginas 265 – 271. Todo el documento.                                                                                                                         | 1-9                        |
| A         | DEMYDA-PEYRAS S et al. "The use of molecular and cytogenetic methods as a valuable tool in the detection of chromosomal abnormalities in horses: a case of sex chromosome chimerism in a spanish purebred colt". Cytogenetic and genome research (2013). Vol. 141, Nº 4, Páginas 277 - 283, todo el documento. | 1-9                        |

#### 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  
26.10.2017

Examinador  
M. Hernandez Cuellar

Página  
2/6

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)

EPODOC, WPI, EBI REGISTRY MEDLINE BIOSIS EMBASE CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.10.2017

**Declaración**

|                                                 |                      |           |
|-------------------------------------------------|----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-9 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones     | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones     | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones 1-9 | <b>NO</b> |

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       | KAKOI H et al. "Genetic diagnosis of sex chromosome aberrations in horses based on parentage test by microsatellite dna and analysis of x- and y-linked markers". Equine veterinary journal (2005).Vol.37, Nº 2, Páginas 143 - 147, .todo el documento. En particular Tabla1. Todo el documento. En particular Tabla1                        | 28.02.2005        |
| D02       | DEMYDA-PEYRAS et al. "The use of a novel combination of diagnostic molecular and cytogenetic approaches in horses with sexual karyotype abnormalities: a rare case with an abnormal cellular chimerism." Theriogenology (2014), Vol. 81, Nº 8, Páginas 1116 - 1122, todo el documento. En particular punto 2.5 pág. 1118; Tabla 2. Pág. 1121 | 30.04.2014        |
| D03       | VILLAGOMEZ D A F et al. "Equine disorders of sexual development in 17 mares including XX, SRY-negative, XY, SRY-negative and XY, SRY-positive genotypes." Sexual Development (2011), Vol. 5, Nº 1, Páginas 16-25 todo el documento.                                                                                                          | 30.11.2010        |
| D04       | GIESECKE KATRIN et al., "infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: a review".Veterinary journal (2010). Vol. 185, Nº 3, Páginas 265 - 271, todo el documento.                                                                                                                                                       | 31.08.2010        |
| D05       | DEMYDA-PEYRAS S et al. "The use of molecular and cytogenetic methods as a valuable tool in the detection of chromosomal abnormalities in horses: a case of sex chromosome chimerism in a spanish purebred colt" Cytogenetic and genome research (2013). Vol. 141, Nº 4, Páginas 277 - 283, todo el documento.                                | 30.11.2012        |

**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**

El documento D01 describe un método combinado de técnicas citogenéticas y de diagnóstico molecular para detectar aberraciones cromosómicas en caballos las cuales son la causa de gran parte de los problemas de infertilidad en caballos

El documento D02 describe un estudio realizado para detectar y caracterizar aberraciones en los cromosoma sexuales de potros recién nacidos mediante prueba de paternidad y análisis utilizando marcadores STR ligados a los cromosomas X e Y. Los documentos D03-D05 divulgan diversos estudios en los que entre otras técnicas se utilizan marcadores STR para analizar la fertilidad en caballos. Estos documentos forman parte del estado de la técnica relativo a la solicitud pero no se consideran relevantes en esta fase del procedimiento

Ninguno de los documentos citados en el estado de técnica describe una combinación idéntica a la definida en la reivindicación 1. Tampoco se han encontrado kits de diagnóstico que incluyan las SEQ ID NO 1-14. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-9 son nuevas de acuerdo al Art.6.1 LP 11/1986.

**2.- ACTIVIDAD INVENTIVA**

El documento D01 describe un estudio realizado para detectar y caracterizar aberraciones en los cromosoma sexuales de potros recién nacidos mediante prueba de paternidad y análisis utilizando marcadores STR ligados a los cromosomas X e Y. Las aberraciones cromosómicas en los cromosomas sexuales se asocian normalmente a síntomas clínicos que afectan a la salud y a la fertilidad de los caballos. En el estudio se demuestra la eficacia del uso de los marcadores moleculares como herramientas de diagnóstico. Los marcadores STR utilizados junto con los cebadores utilizados para realizar las correspondientes amplificaciones se indican en la Tabla 1. Entre los marcadores indicados se encuentran todos los reivindicados en la invención. Por tanto, el documento D01 se considera el estado de la técnica más cercano a la invención. En este sentido el problema técnico subyacente se podría plantear como la selección de una combinación de marcadores STR para detectar aberraciones cromosómicas en potros. La solución proporcionada por la invención consiste en la combinación de marcadores formada por: los marcadores ECAX: LEX026, TKY38, TKY270, LEX003, UCDEQ502, y los marcadores ECAY: 5 Eca.YH12 y SRY así como las correspondientes secuencias de los cebadores (SEQ ID Nº1-14) para realizar su amplificación.

Los marcadores de la invención se encuentran descritos en la tabla 1 de D01. Asimismo también se encuentran descritas las secuencias de los cebadores, que son idénticas a las SEQ ID Nº 1 y 3-12 reivindicadas en el kit de la invención. En este sentido, la diferencia entre D01 y la combinación de la invención radica en que la combinación de la invención está formada por tres marcadores menos y proporciona tres secuencias distintas. Tomando como punto de partida D01, se considera que un experto en la materia enfrentado al problema técnico mencionado, realizaría la selección de la invención con expectativas razonables de éxito mediante la aplicación de técnicas rutinarias y habituales de diagnóstico molecular.

El documento D02 describe un método combinado de técnicas citogenéticas y de diagnóstico molecular para detectar aberraciones cromosómicas en caballos las cuales son la causa de gran parte de los problemas de infertilidad en caballos. En particular se describe el caso de un Caballo de pura raza español que muestra un cariotipo aberrante detectado mediante el uso de un conjunto específico de marcadores STR relacionados con los cromosomas sexuales y técnicas de citogenética molecular. También comparamos los resultados obtenidos en el análisis de diferentes muestras de tejido para determinar la existencia de sangre o quimerismo verdadero. En el punto 2.5 de la página 1118 se indican los marcadores utilizados. Por una parte se utilizaron cebadores para amplificar genes estrechamente relacionados con el desarrollo sexual en mamíferos: SRY, ZFX Y. Por otra parte se utilizaron 24 marcadores STR. Entre estos marcadores, 16 corresponden a marcadores comerciales utilizados para test de paternidad. Adicionalmente, se utilizó un panel extra con 8 nuevos marcadores ligados a los cromosomas sexuales: LEX026, TKY38, TKY270, LEX003, UCDEQ502) y ligados al ECAX y ECAYH12, ECAYA16, and ECAYM2 ligados a ECAY. Se utilizaron cebadores descritos en el estado de la técnica previamente (Tabla 2. Pág. 1121). Tal y como indican los autores, el uso de los nuevos marcadores STR permite una detección más rápida y precisa de las anomalías cromosómicas sexuales que constituye un problema grave y generalmente no diagnosticado asociado con problemas reproductivos en caballos. Considerando D02 como el estado de la técnica más próximo a la invención, el problema técnico subyacente se podría plantear como la provisión de una nueva combinación de marcadores SRT para detectar aberraciones cromosómicas en caballos. La diferencia entre D02 y la combinación de la invención radica en la inclusión del marcador SRY y la exclusión de los marcadores ECAYA16, and ECAYM2. Un experto en la materia enfrentado a tal problema encontraría en el estado de la técnica el documento D01 y obviamente intentaría combinar los diferentes marcadores y para llegar a seleccionar la combinación de la invención con unas expectativas razonables de éxito mediante la aplicación de técnicas rutinarias y habituales de diagnóstico molecular.

Ambos razonamientos son aplicables al kit de diagnóstico y los cebadores que lo componen.

Finalmente, la rapidez y precisión que aporta la combinación de la invención y su correspondiente kit no se puede considerar que impliquen un efecto técnico inesperado o sorprendente con respecto a las combinaciones descritas en los documentos D01 y D02.

Por todos los argumentos mencionados anteriormente, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-9 no cumplen el requisito de actividad inventiva estipulado en el Art. 8.1 LP 11/1986.