



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 137 106**

② Número de solicitud: 009700646

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: A23K 1/16  
A23K 1/18

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **25.03.1997**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.1999**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.12.1999**

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
**Avda. Teniente Flomesta, s/n**  
**Edf. Convalecencia, 3ª plta.**  
**30003 Murcia, ES**

⑦ Inventor/es: **Meseguer Peñalver, José;**  
**Esteban Abad, María Angeles y**  
**Mulero Méndez, Victoriano**

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Aplicación del levamisol en la fabricación de productos dietéticos inmunoestimulantes para peces.**

⑤ Resumen:

Aplicación del levamisol en la fabricación de productos dietéticos inmunoestimulantes para peces. El levamisol tiene utilidad para la fabricación de suplementos dietéticos y productos alimenticios destinados a aumentar la respuesta inmunitaria en peces, especialmente teleósteos, como lubina y dorada. Dicha utilidad tiene especial interés en Piscicultura, particularmente en el cultivo de teleosteos.

ES 2 137 106 A1

## DESCRIPCION

Aplicación del levamisol en la fabricación de productos dietéticos inmunoestimulantes para peces.

### Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico del cultivo a nivel industrial de teleósteos marinos, en especial dorada y lubina.

Más específicamente, la presente invención, pone de manifiesto la utilidad del levamisol, en la fabricación de productos dietéticos para peces.

### Estado de la técnica anterior a la invención

El efecto del levamisol (isómero levo del 2,3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazol ((2,1b)tiazol) sobre la respuesta inmunitaria en peces ha sido escasamente estudiado. Sólo existen escasas publicaciones en la literatura realizadas sobre dos especies de agua dulce que son la trucha arco iris (*Onmykiss*) y la carpa (*Cyprinus carpio*):

Siwicky A (1987) Immunomodulating activity of levamisole in carp spawners, *Cyprinus carpio* L. J Fish Biol 31:245-246.

Siwicky AK (1989) Immunomodulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp (*Cyprinus carpio*). De, Comp Immunol 13:87-91.

Siwicky AK, Anderson DP, Dixon OW (1989) Comparisons of nonspecific and specific immunomodulation by oxolinic acid, oxytetracycline and levamisole in salmonids.

Vet Immunol Immunopathol 23:195-200.

Siwicky AK, Anderson DP, Dixon OW (1990) In vitro immunostimulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spleen cells with levamisole. Dev Comp Immunol 14:231-237.

Anderson DP, Jeney G (1992) Immunostimulants added to injected *Aeromonas Salmonicida* bacterin enhance the defense mechanisms and protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Vet Immunol Immunopathol 34:379389.

Kajita Y, Sakai M, Atsuta S, Kobayashi M (1990). The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Pathol 25:9398.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a la aplicación del levamisol en la fabricación de suplementos dietéticos y productos alimenticios para peces, destinados a aumentar su respuesta inmunitaria.

Durante los diez últimos años, los inventores han dedicado su actividad investigadora al estudio del sistema inmunitario inespecífico de dos teleósteos marinos, de interés para el cultivo a nivel industrial, la dorada (*Sparus aurata* L.) y la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Los trabajos se han desarrollado en fases sucesivas, en las que se ha abordado el estudio tanto de los tipos celulares como de los factores humorales implicados en dicha respuesta. Se han caracterizado los tipos de células que median la respuesta inespecífica, mediante aplicación de métodos microscópicos, histoquímicos, aislamiento y cultivo de células, y citometría de flujo. Así mismo, se han caracterizado los factores humorales tipo complemento, mediante métodos de estudio de las actividades hemolítica, quimiotáctica y opsonica del suero y

se ha estimulado la producción por leucocitos de factores solubles tipo MAF mediante el uso de mitógenos (Concanavalina A).

Una vez caracterizadas las células y los factores solubles implicados en la respuesta inmunitaria inespecífica de estas especies, se ha procedido al estudio de diferentes aspectos funcionales de esta respuesta. En concreto, se ha establecido el proceso de defensa fagocítica frente a bacterias patógenas y el de respuesta citotóxica frente a células tumorales (equivalente a la respuesta frente a células infectadas por virus).

Teniendo como base el conocimiento obtenido de esta investigación previa, se ha procedido a analizar la capacidad inmunomoduladora del levamisol sobre la respuesta inmunitaria inespecífica de la dorada, ya que la escasa bibliografía existente parece indicar que el levamisol posee capacidad inmunoestimuladora en peces, aunque no se dispone de resultados definitivos. Además, porque el uso del levamisol ha sido previamente aprobado en Estados Unidos por "The United States Food and Drug Administration" para su aplicación como antihelmíntico en rumiantes. Por ello, también puede ser considerado de interés en la alimentación de peces.

La presente invención se basa en experimentos in vivo que por primera vez han puesto de manifiesto la actividad inmunomoduladora del levamisol sobre los referidos ejemplares de peces objeto de estudio.

Los experimentos se han diseñado con la intención de establecer la dosis, frecuencia, duración y efecto del tratamiento sobre los ejemplares objeto de estudio.

Los resultados obtenidos informan que a dosis, frecuencia y duración de tratamiento adecuados el levamisol produce:

1. Activación de la respuesta humoral inespecífica (complemento).
2. Activación de la respuesta celular inespecífica: incremento de la explosión respiratoria, del porcentaje de fagocitos implicados y del número medio de bacterias fagocitadas por célula.
3. Reducción de la mortalidad frente a infecciones experimentales con *Listonella anguillarum* (conocida comunmente como *vibrio anguillarum*).

De acuerdo con lo anterior, el levamisol es susceptible de ser utilizado con fines industriales en la fabricación de suplementos dietéticos y productos alimenticios para peces, destinados a prevenir infecciones bacterianas, ya que incrementa la respuesta inmunitaria inespecífica produciendo protección frente a infección por bacterias patógenas, y de modo más concreto en dorada frente a *L. anguillarum*.

### Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes experimentos, que no son en absoluto limitativos de su alcance.

Los experimentos se desarrollaron en dos etapas:

- A) Primero se procedió al estudio de los efectos del levamisol suministrado en dieta, a dis-

tintas dosis, sobre diferentes parámetros del sistema inmunitario inespecífico de dorada.

- B) Posteriormente, conocida la dosis de levamisol óptima, se procedió a tratar ejemplares de dorada con dicha dosis de levamisol tras lo cual, se les realizó una infección experimental con el fin de saber si el tratamiento confiere protección frente a la bacteria patógena control (*Listonella anguillarum*).

A) *Efecto del levamisol sobre el sistema inmunitario inespecífico de la dorada* (*Sparus aurata*).

A.1. *Metodología concreta*

La metodología concreta desanollada para llevar a cabo el estudio de los efectos del levamisol, suministrado en dieta, sobre el sistema inmunitario de dorada, fue la que se detalla a continuación:

Ejemplares de dorada de 100 g de peso medio fueron mantenidos en acuarios de 260 litros conteniendo agua marina, con un flujo de 1500 l/h y fotoperiodo de 12 horas luz. Fueron alimentados con pienso comercial (Purina) en cantidad equivalente al 1% de su peso corporal.

Se establecieron cuatro grupos de animales de quince ejemplares cada uno (colocando cada grupo en un acuario distinto). Los animales fueron alimentados con pienso al que se le había adicionado, previamente y en propio laboratorio, diferentes cantidades de levamisol. En concreto, se establecieron los siguientes grupos:

Grupo 1: 0 mg levamisol/Kg de pienso (grupo control, o grupo no tratado).

Grupo 2: 125 mg levamisol/Kg de pienso

Grupo 3: 250 mg levamisol/Kg de pienso

Grupo 4: 500 mg levamisol/Kg de pienso

Estas dietas fueron administradas en cinco tomas semanales durante dos semanas (diez tomas totales).

La ingesta total de levamisol por los ejemplares fue la siguiente:

Grupo 1: 0 mg/pez

Grupo 2: 1,25 mg/pez

Grupo 3: 2,5 mg/pez

Grupo 4: 5 mg/pez

Una vez acabado el tratamiento, todos los peces fueron alimentados con pienso sin suplementar con levamisol, es decir, pienso igual que el del grupo control, durante diez semanas más.

Finalizado el tratamiento con levamisol, cinco ejemplares de cada uno de los grupos de estudio fueron sacrificados a las 0, 5 y 10 semanas. Los animales fueron entonces pesados, medidos y diseccionados con el fin de obtener muestras de sangre y de riñón cefálico (principal órgano hematopoyético de dorada).

Muestras de sangre fueron utilizadas para determinar el hematocrito de los ejemplares. Otras muestras de sangre se dejaron coagular para obtener el suero que fue congelado a -80°C. Cuando se dispuso de todas las muestras, se determinó la proteinemia (mediante el método colorimétrico de Bradford) (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72:248254) y la actividad del complemento por la vía alternativa (inespecífica) mediante ensayos de hemólisis de eritrocitos de carnero (Yano, 1992, Techniques in Fish Immunology SOS Pub).

Leucocitos de riñón cefálico fueron obtenidos por aislamiento y centrifugación en gradiente discontinuo de densidad de Percoll (34%-51%) (Braun-Nesje y col., 1.981, J. Fish Dis. 4:141-151). Una vez aislados, se determinaron mediante citometría de flujo las diferentes poblaciones de leucocitos presentes y su actividad fagocítica frente a la bacteria patógena de peces, y en particular de dorada, *Listonella anguillarum*, previamente marcada con isotiocianato de fluoresceína (Harvath y Terle, 1.994, Mol. Biol. 34:249-259). Finalmente, se evaluó la explosión respiratoria de los leucocitos mediante el ensayo colorimétrico de reducción del NBT (nitro-blue tetrazolio) (Pick y col., 1.981, J. Reticuloendotel. Soc. 30:581-593)

A.2 *Estado general de los ejemplares*

Los ejemplares tratados con levamisol presentaron un hematocrito inferior (10 puntos) con respecto al obtenido para los ejemplares del grupo control, tanto a las 0 como a las 5 semanas tras el tratamiento. Se observaron valores normales a las 10 semanas de haber finalizado el tratamiento.

A.3 *Respuesta humoral*

Tanto los niveles del complemento como los de proteínas totales del suero de los ejemplares tratados, con las 3 concentraciones de levamisol ensayadas, fueron superiores a los obtenidos para los ejemplares del grupo control, tanto a las 5 como a las 10 semanas de finalizar el tratamiento. El efecto observado en ambos parámetros fue dosis dependiente. Estos resultados indican que el levamisol potencia la inmunidad humoral de la dorada, en concreto el sistema de complemento, perdurando este efecto al menos 10 semanas.

A.4 *Respuesta celular*

Los leucocitos obtenidos de ejemplares tratados con dietas conteniendo 250 ó 500 mg de levamisol por Kg. de pienso, mostraron a las 0 y 5 semanas de finalizar el tratamiento una mayor capacidad fagocítica frente a la bacteria *Listonella anguillarum*, así como una mayor explosión respiratoria. La capacidad fagocítica se vio aumentada en dos sentidos, por un lado en el número de células que mostraron esta actividad, y por otro, en el número medio de bacterias interiorizadas por fagocito. A las 10 semanas, este último parámetro seguía siendo superior al obtenido para leucocitos aislados de ejemplares no tratados o control. Estos resultados indican que el levamisol es capaz de potenciar la respuesta inmunitaria inespecífica a nivel celular, en concreto la activación de los leucocitos, estimada mediante el aumento observado en la explosión respiratoria, y la capacidad fagocítica de estas células. Esta activación del sistema inmunitario inespecífico a nivel celular es muy rápida, ya que se aprecia inmediatamente después de finalizar el tratamiento con levamisol, y se mantiene durante algo más de cinco semanas.

B) *Efecto del levamisol sobre la protección frente a infección por Listonella anguillarum*.

B.1. *Metodología concreta*

Se establecieron 4 grupos de animales de 20 ejemplares cada uno que fueron mantenidos en acuarios diferentes, tal y como se ha indicado en el apartado anterior. La dosis de levamisol en dieta elegida como óptima para este ensayo fue la de 500 mg de levamisol por Kg de pienso,

de acuerdo con los resultados obtenidos previamente. El levamisol fue administrado a dos de los grupos de animales en cinco tomas semanales durante dos semanas (diez tomas totales). A los otros dos grupos de animales se les suministró pienso sin levamisol (grupos control). Finalizado el tratamiento, todos los ejemplares fueron alimentados con pienso sin suplementar con levamisol durante un periodo de cuatro semanas. Transcurridas dichas cuatro semanas, a los ejemplares se les provocó una infección experimental mediante inyección intraperitoneal de la cepa virulenta R-82 de la bacteria patógena para dorada *L. anguillarum* (Toranzo y Barja, 1990, Dis. Aquat. Org. 9:73-82). La infección se realizó mediante inyección de  $10^8$  bacterias/pez o  $5 \times 10^8$  bacterias/pez de acuerdo con la experiencia obtenida de estudios previos. Los grupos de estudio fueron los siguientes:

Grupo 1: 0 mg levamisol/Kg pienso (pienso control) + infección con  $10^8$  bacterias.

Grupo 2: 0 mg levamisol/Kg pienso (pienso control) + infección con  $5 \times 10^8$  bacterias

Grupo 3: 500 mg levamisol/Kg pienso + infección con  $10^8$  bacterias.

Grupo 4: 500 mg levamisol/Kg pienso + infección con  $5 \times 10^8$  bacterias

El número de animales supervivientes en cada uno de los grupos de estudio establecidos fue es-

timado durante los 30 días posteriores a la infección.

Tras efectuar la infección experimental con la bacteria se obtuvo tan solo un 37 % de mortalidad en los grupos de animales infectados y alimentados con pienso conteniendo levamisol. En contraste, los grupos de animales que no fueron tratados con levamisol (control) alcanzaron un 55 % y un 90 % de mortalidad cuando fueron infectados con  $10^8$  y  $5 \times 10^8$  bacterias, respectivamente.

#### Conclusiones

De los resultados de los anteriores experimentos se pueden obtener las siguientes conclusiones:

1. El levamisol administrado en la dieta potencia la respuesta inmunitaria inespecífica tanto a nivel humoral (actividad del complemento) como celular (fagocitosis y explosión respiratoria) de los ejemplares de dorada.

2. Los efectos del levamisol sobre la respuesta inmunitaria inespecífica de la dorada se manifiestan rápidamente, siendo detectables inmediatamente después de finalizar el tratamiento, alcanzándose valores máximos a las 5 semanas y se mantienen durante al menos 10 semanas.

3. La inmunoestimulación producida por el levamisol en la dorada se ve correlacionada con una mayor protección de los ejemplares tratados respecto de los no tratados frente a posibles infecciones causadas por bacterias.

**REIVINDICACIONES**

1. Aplicación del isómero levo del 2, 3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazol-(2,1-b)tiazol (levamisol), en la fabricación de suplementos dietéticos y productos alimenticios para peces, destinados a au-

mentar la respuesta inmunitaria en peces.

2. Aplicación del levamisol, según la reivindicación 1, en que los peces son teleósteos.

3. Aplicación del levamisol según la reivindicación 2, en que los peces están seleccionados entre dorada y lubina.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: A23K 1/16, 1/18

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SIWICKI, A.K. Immunostimulating influence of levamisole on nonspecific immunity in carp ( <i>Cyprinus carpio</i> ). <i>Developmental and Comparative Immunology</i> , 1989, Vol. 13, páginas 87-91.	1-3
X	WO 9708960 A (TETRAWERKE DR. RER. NAT. ULRICH BAENSCH GMBH) 13.03.1997, reivindicaciones 1,3,6,8.	1-3
A	BASE DE DATOS OCEAN en STN. AN:95:3913; JENEY, G. et al. Effect of immunostimulation on the non-specific immune response of sea bass, <i>Dicentrarchus labrax</i> , L. 1994. Meeting info: International Symposium on aquatic animal health. Seattle, WA (USA) 4-8 Sep. 1994, resumen.	
A	KAJITA, Y. et al. The immunomodulatory effects of levamisole in rainbow trout, <i>Onchorhynchus mykiss</i> . <i>Fish pathology</i> . 1990. Vol. 25 (2), páginas 93-98.	
A	SIWICKI, A.K. et al. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout effects non-specific immunity and protection against furunculosis. <i>Veterinary Immunology and Immunopathology</i> , 1994, Vol. 41, páginas 125-139.	

**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 n.º:

**Fecha de realización del informe**

25.10.1999

**Examinador**

A. Polo Díez

**Página**

1/1