



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 249 167**

② Número de solicitud: 200402118

⑤ Int. Cl.:

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **01.09.2004**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2006**

Fecha de la concesión: **19.04.2007**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2007**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Peña Llopis, Samuel y
Peña Forner, Juan B.**

⑳ Agente: **No consta**

② Título: **Aditivo para piensos de peces de cultivo y pienso que contiene dicho aditivo para tratar y prevenir el estrés oxidativo y la toxicidad de los tratamientos parasiticidas.**

③ Resumen:

Aditivo para piensos de peces de cultivo y pienso que contiene dicho aditivo para tratar y prevenir el estrés oxidativo y la toxicidad de los tratamientos parasiticidas.

La presente invención proporciona el uso de un aditivo para piensos destinado al cultivo de peces y un pienso que contiene dicho aditivo, que es efectivo en contrarrestar el estrés oxidativo, y especialmente, la toxicidad ocasionada por los tratamientos con plaguicidas utilizados en la eliminación de los parásitos de los teleosteos. El aditivo para piensos consiste en una cantidad efectiva de N-acetilcisteína, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que es capaz de estimular la síntesis intracelular de glutatión e inducir la actividad glutatión S-transferasa en los peces.

ES 2 249 167 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Aditivo para piensos de peces de cultivo y pienso que contiene dicho aditivo para tratar y prevenir el estrés oxidativo y la toxicidad de los tratamientos parasiticidas.

Sector de la técnica

Destinado al sector de la acuicultura continental y marina. La presente invención proporciona un aditivo de piensos de peces y un pienso que contiene dicho aditivo para mitigar los procesos oxidativos inherentes al cultivo de teleosteos, y especialmente, para prevenir y tratar intoxicaciones por los parasiticidas empleados en las piscifactorías.

Estado de la técnica

El rápido crecimiento y desarrollo de la acuicultura ha sido paralelo a la utilización de sustancias químicas para mejorar la salud animal. Las infecciones de parásitos causan en los peces estrés y susceptibilidad a desarrollar otras patologías que suponen importantes pérdidas para la industria. Entre las medicinas y productos químicos existentes, los plaguicidas organofosforados como el azametifós han sido extensivamente empleados como antiparasitarios en cultivos como el del salmón para tratar las infecciones por la pulga de mar (O'Halloran y Hogans, 1996, Can. Vet. J. 37: 610-611; Roth *et al.*, 1996, Aquaculture 140: 217-239; Revie *et al.*, 2002, Vet. Rec. 151: 753-757). Además el azametifós ha mostrado su eficacia y seguridad frente a ectoparásitos en la anguila, la lubina y la trucha (Pretti *et al.*, 2002, J. Vet. Pharmacol. Ther. 25: 155-157; Intorre *et al.*, 2004, Pharmacol. Res. 49: 171-176). No obstante, en el tratamiento de los ectoparásitos de peces se utilizan otros compuestos que también son neurotóxicos, como son las piretrinas o piretroides, entre las que destacan la cipermetrina y deltametrina (Roth, 2000, Contrib. Zool. 69: 109-118). Además, se ha demostrado que tanto los plaguicidas organofosforados como piretroides producen una disminución de los niveles de glutatión y conducen a un estado de estrés oxidativo a nivel celular (Bagchi *et al.*, 1995, Toxicology 104: 129-140; Gupta *et al.*, 1999, J. Appl. Toxicol. 19: 67-72).

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre la generación de radicales libres y su eliminación por parte de los antioxidantes celulares. Éste está caracterizado por la inactivación de proteínas (y por tanto de enzimas), peroxidación de los lípidos de membrana y daños en el ADN. El glutatión (GSH) es un tripéptido compuesto por glutamato, cisteína y glicina que es indispensable en la mayoría de organismos vivos, ya que interviene en varios fenómenos celulares de gran importancia, tales como la destoxicación de xenobióticos, la eliminación de radicales libres, el mantenimiento del estado reducido en los grupos tioles de las proteínas (al actuar como un tampón redox), la modulación de la función inmune y la síntesis de ADN (Meister y Anderson, 1983, Annu. Rev. Biochem. 52: 711-760). El GSH tiene transportadores específicos para exportarse fuera de las células, pero en cambio no lo tiene para su importación, necesitando ser catabolizado para luego ser sintetizado intracelularmente. Puesto que numerosas enfermedades y situaciones fisiopatológicas se caracterizan por presentar bajos niveles intracelulares de glutatión, para aumentar estos niveles es necesario proporcionar un precursor de su síntesis.

La *N*-acetilcisteína (NAC) destaca entre los antioxidantes actuales ya que no sólo es capaz de eliminar directamente a los radicales libres, sino que también es capaz de ser desacetilada intracelularmente para dar lugar al aminoácido L-cisteína, que es el limitante en la síntesis de glutatión. Se conocen composiciones farmacéuticas que contienen *N*-acetilcisteína para tratar la deficiencia de glutatión y/o el estrés oxidativo en humanos y otros mamíferos, tales como las patentes US 2002/0142991 (*N*-acetylcysteine compositions and methods for the treatment and prevention of drug toxicity; fecha de publicación 2002-10-03) y EP1171112 (Use of *N*-acetylcysteine for the preparation of a medicament suitable for the intravenous administration to prevent oxidative stress in dialysed patients; fecha de publicación 2002-01-16). Sin embargo, la investigación enfocada a paliar el estrés oxidativo o los efectos tóxicos de los parasiticidas para que los peces tengan un mayor estado de salud es escasa. Por esta razón, hay un gran interés en la búsqueda de un nuevo aditivo para piensos que confiera una mayor tolerancia al estrés oxidativo y a la toxicidad de los parasiticidas empleados en los peces de cultivo. Los inventores previamente descubrieron que la administración de la *N*-acetilcisteína por vía intraperitoneal permite la regeneración de los niveles de glutatión y aumenta la tolerancia de los peces al plaguicida organofosforado diclorvós (Peña-Llopis *et al.*, 2003, Aquat. Toxicol. 65: 337-360). Además, cuando se administra la *N*-acetilcisteína mediante baños terapéuticos permite una mayor recuperación de los peces tras una intoxicación por este grupo de plaguicidas (Peña-Llopis *et al.*, 2003, Dis. Aquat. Organ. 55: 237-245). A pesar del bajo coste de la *N*-acetilcisteína, es más factible proporcionar este compuesto en el pienso de los peces que administrarlo mediante baños terapéuticos y, por supuesto, mediante inyecciones. No obstante, la eficacia de la *N*-acetilcisteína administrada como aditivo de piensos en peces no ha sido descrita hasta la actualidad y sus resultados no se pueden deducir de las observaciones previas ya que no se puede generalizar que la NAC aumenta la síntesis de glutatión intracelular en peces cuando se administra por vía intraperitoneal o por baños. Hay que considerar que según cada vía de administración se obtienen unos resultados diferentes.

La inyección intraperitoneal permite la distribución del fármaco por todos los tejidos. Por esa razón se ha observado un aumento de la síntesis de glutatión tanto en el hígado como en el músculo de los peces.

Los baños terapéuticos permiten una absorción cutánea del fármaco. Así, se ha observado que los baños de NAC aumentan los niveles de glutatión en el músculo esquelético pero no en el hígado de los peces. La cantidad de NAC que llega al torrente sanguíneo a través de la absorción no es suficiente para aumentar la síntesis hepática de glutatión.

Respecto a la vía oral, cabría esperar que el fármaco se absorbiese en el intestino y llegase al hígado por la vena porta. Por lo tanto no se puede inferir que el resultado observado en la vía oral sea obvio a partir de las anteriores vías de administración.

5 Igualmente, cabe destacar el propio metabolismo de la síntesis de glutatión. La síntesis intracelular de glutatión está regulada por retroalimentación negativa, en la que el exceso de GSH inhibe la síntesis del propio GSH.

Además, la síntesis tiene lugar principalmente en el hígado porque es el único órgano que contiene las enzimas necesarias para realizar la transsulfuración, es decir, pasar la metionina a cisteína, que es el aminoácido limitante en la síntesis de GSH. De esta manera, sólo en el caso en el que haya una disminución de los niveles basales de GSH (que son diferentes en cada especie) a causa de una enfermedad o exposición a un xenobiótico, por ejemplo, habrá un aumento en la síntesis de GSH, a no ser que el aporte de la dieta sea insuficiente para proporcionar la cisteína intracelular necesaria. Así por ejemplo, la NAC administrada por vía oral a voluntarios sanos no produce un aumento de GSH plasmático. Sin embargo, al presentar un GSH disminuido a causa de un tratamiento con paracetamol, es cuando tiene efecto la NAC para aumentar la síntesis de GSH (Burgunder *et al.*, 1989, Eur. J. Clin. Pharmacol. 36: 127-131). Por esta razón, conocer si los piensos comerciales para peces contienen los nutrientes suficientes para mantener una síntesis elevada de GSH en los peces no es algo que resulte evidente a partir del estado de la técnica.

20 En la presente invención también se señala el aumento de la destoxificación celular (y en concreto de los plaguicidas) mediante la inducción de la actividad glutatión S-transferasa GST por la NAC. En la patente WO03/024487 se pone de manifiesto la destoxificación celular, pero ésta se obtiene a partir de la administración de un ingrediente activo seleccionado entre los glucósidos iridoides y lignanos, pero no por la NAC. Por esta razón, el hecho de que la NAC administrada en el pienso aumente la actividad GST, y por tanto la destoxificación celular, no está contemplado en el estado de la técnica y no se puede deducir de ésta.

En la patente WO03/024487 (Method of increasing the presence of glutathione in cells, solicitante: N.V. NUTRICIA) han sido extrapolados resultados obtenidos en humanos para el caso de ganado y aves. Las diferencias evolutivas entre los mamíferos y vertebrados inferiores como los peces son demasiado grandes por lo que no se pueden extrapolar estos resultados y por lo tanto no resulta evidente a partir del estado de la técnica.

Descripción de la invención

Descripción breve

35 La presente invención proporciona el uso de un aditivo de piensos destinado al cultivo de peces y un pienso que contiene dicho aditivo, caracterizado por contener una cantidad efectiva del antioxidante *N*-acetilcisteína para (1) aumentar la síntesis de glutatión, (2) aumentar la destoxificación celular, (3) mitigar los efectos tóxicos producidos por los parasiticidas utilizados en el cultivo de los peces y (4) proporcionar una mayor tolerancia a los procesos oxidativos generados por infecciones o condiciones naturales como la exposición a la radiación ultravioleta. Las propiedades de este pienso lo hacen idóneo para alimentar a peces que son frecuentemente tratados con parasiticidas que disminuyen los niveles de glutatión y producen estrés oxidativo.

Descripción detallada

45 El glutatión es el tiol de bajo peso molecular más abundante y el principal antioxidante de todas las formas eucariotas de vida. Además, permite la regeneración de otros antioxidantes como las vitaminas C y E (Chan, 1993, Can. J. Physiol. Pharmacol. 71: 725-731). El glutatión está presente mayoritariamente en las células en su forma activa y reducida (GSH). Sin embargo, como consecuencia de las condiciones oxidantes, dos moléculas de GSH que hayan captado un radical libre se pueden unir por un puente disulfuro para generar una molécula de glutatión oxidado o disulfuro (GSSG) y eliminar dichos radicales. Si se acumula el GSSG, éste se exporta fuera de las células para evitar cambios en el estado redox celular que podrían dar lugar a la muerte celular. Esto supone una disminución en los niveles totales de glutatión. Por otra parte, el GSH se puede conjugar a una gran variedad de compuestos tóxicos, tanto de manera espontánea como catalizado por la glutatión S-transferasa (GST), lo que implica el consumo irreversible de GSH.

50 Teniendo en cuenta que la síntesis intracelular de glutatión está regulada por retroalimentación negativa, en la que el exceso de GSH inhibe la síntesis de este tripéptido (Richman y Meister, 1975, J. Biol. Chem. 250: 1422-1426), los inventores han tenido éxito en encontrar que la administración de NAC como aditivo de piensos es capaz de aumentar los niveles de GSH de los peces. Esto implica que el pienso control con el que se alimentan normalmente los peces no está capacitado para proporcionar suficiente L-cisteína a nivel intracelular como para saturar la síntesis de GSH. De esta manera, el aumento en el contenido de glutatión y en la relación GSH/GSSG encontrado en los peces alimentados con el aditivo para piensos del presente invento permite eliminar más eficazmente a los radicales libres y tener una mayor tolerancia frente a una posible situación de estrés oxidativo. Los peces cultivados en jaulas flotantes están sometidos continuamente a radiaciones ultravioleta, las cuales generan radicales libres y pueden causar estrés oxidativo, fotoactivación de contaminantes orgánicos y fotosensibilidad (Zagarese y Williamson, 2001, Fish Fisheries 2: 250-260). Además, se ha observado que una infección parasitaria también puede producir estrés oxidativo en los peces (Belló *et al.*, 2000, Dis. Aquat. Org. 42: 233-236). El estrés oxidativo puede conducir a los peces a situaciones

de anemia o de infecciones oportunistas. Ante esto, la presente invención proporciona un aditivo para piensos que es efectivo para combatir el estrés oxidativo en los peces.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que el aditivo para piensos de la presente invención es capaz de inducir la actividad glutatión *S*-transferasa (GST) en los tejidos de los peces de cultivo. El incremento en la actividad GST junto a niveles más altos de GSH permite detoxificar una gran variedad de contaminantes con una mayor eficacia. Por esta razón, el aditivo para piensos de la presente invención contribuye significativamente a que los peces tengan una mayor tolerancia a los xenobióticos.

El principal mecanismo de acción de los plaguicidas organofosforados es la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) de una manera dosis-dependiente. Los inventores han descubierto inesperadamente que el aditivo para piensos de la presente invención mantiene o aumenta la actividad AChE del cerebro de los peces durante las 6 primeras horas tras una etapa de desparasitación con el plaguicida azametifós, mientras que esta actividad se ve sensiblemente inhibida en los peces alimentados con el pienso control. Esto significa que estos peces se encuentran en condiciones más óptimas de afrontar una situación adversa como una exposición a plaguicidas y se recuperan antes de su intoxicación. Además, los peces alimentados con el pienso que contiene el aditivo para piensos de la presente invención presentaron una menor pérdida y oxidación del glutatión, al igual que presentaron una mayor capacidad de detoxificación al inducir la actividad GST.

El aditivo para piensos de la presente invención se puede formular tal cual o como una sal farmacéuticamente aceptable de la *N*-acetilcisteína. El término “sal farmacéuticamente aceptable” significa todas aquellas sales que son aptas para el contacto de los tejidos animales sin que se produzca toxicidad, irritación, reacción alérgica y están acorde con una relación riesgo/beneficio razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por un especialista en la técnica, siendo la sal sódica la más común.

Compuestos que son capaces de aumentar los niveles intracelulares de glutatión son bien conocidos e incluyen, pero no están limitados a, la *N*-acetilcisteína, el ácido α -lipoico, los ésteres de glutatión, la *N*-(2-mercaptopropionil) glicina, el ácido 2-oxotiazolidina-4-carboxílico y sus ésteres.

El aditivo para piensos de la presente invención puede utilizarse para preparar piensos para peces mediante una mezcla uniforme de los ingredientes y una posterior extrusión o granulación. Asimismo, la NAC puede microencapsularse previamente a la extrusión o granulación para disminuir su solubilidad en el pienso y así aumentar su estabilidad. Además, la adición del aditivo de la presente invención puede llevarse a cabo mediante una pulverización de un pienso comercial con una disolución de NAC, que se dejaría secar para que se retenga el aditivo en el pienso. Estos métodos son bien conocidos por los especializados en la materia.

La presente invención es aplicable a cualquier tipo de pez en cuyo cultivo se presenten problemas de estrés oxidativo o haya algún tratamiento por parasitocidas que disminuyan los niveles de glutatión o produzcan un estrés oxidativo en los peces. De destacar son los cultivos de la anguila, salmón, trucha, lubina y dorada.

Breve descripción del contenido de las figuras

Figuras 1A y 1B - Contenido en glutatión reducido (GSH) (1A) y nivel del estado redox del glutatión (GSH/GSSG) (1B) en el hígado de las anguilas alimentadas durante 6 meses con las dietas experimentales y expuestas a 0,1 $\mu\text{g/L}$ de azametifós durante 30 min. Estas figuras muestran una disminución del contenido de GSH, y especialmente, una oxidación del estado redox del glutatión en el hígado de los peces alimentados con el pienso control tras la intoxicación con el plaguicida, mientras que se mantienen estos niveles en los animales alimentados con *N*-acetilcisteína. Los asteriscos expresan las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo según los contrastes dentro del ANOVA de dos factores, siendo *, **, $P < 0,05$ y 0,01, respectivamente. Los valores representan la media \pm el error estándar (n=6 animales).

Figuras 2A y 2B - Contenido en glutatión reducido (GSH) (2A) y nivel del estado redox del glutatión (GSH/GSSG) (2B) en el músculo de las anguilas alimentadas durante 6 meses con las dietas experimentales y expuestas a 0,1 $\mu\text{g/L}$ de azametifós durante 30 min. Estas figuras muestran una disminución y oxidación de los niveles de glutatión en el músculo de los peces como consecuencia de la etapa de desparasitación, existiendo una disminución de GSH mayor en los animales alimentados con la dieta control respecto a los alimentados con el pienso que contiene *N*-acetilcisteína. Los asteriscos expresan las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo según los contrastes dentro del ANOVA de dos factores, siendo *, **, $P < 0,05$ y 0,01, respectivamente. Los valores representan la media \pm el error estándar (n=6 animales).

Figuras 3A y 3B - Actividad glutatión *S*-transferasa (GST) en el hígado (3A) y músculo (3B) de las anguilas alimentadas durante 6 meses con las dietas experimentales y expuestas a 0,1 $\mu\text{g/L}$ de azametifós durante 30 min. Estas figuras muestran como la actividad GST se induce en el hígado y músculo de los peces alimentados con el pienso suplementado con *N*-acetilcisteína, por lo que dichos animales tienen mayor capacidad para detoxificar al plaguicida. Los asteriscos expresan las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo según los contrastes dentro del ANOVA de dos factores, siendo *, **, ***, $P < 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente. Los valores representan la media \pm el error estándar (n=6 animales).

ES 2 249 167 B1

Figura 4 - Actividad acetilcolinesterasa (AChE) en el cerebro de las anguilas alimentadas durante 6 meses con las dietas experimentales y expuestas a 0,1 $\mu\text{g/L}$ de azametifós durante 30 min. Esta figura muestra la inhibición de la actividad acetilcolinesterasa como consecuencia de la toxicidad del plaguicida organofosforado y como se va recuperando dicha actividad respecto al tiempo. Sin embargo, los peces alimentados con el pienso enriquecido con *N*-acetilcisteína presentaron una recuperación más rápida. Los asteriscos expresan las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo según los contrastes dentro del ANOVA de dos factores, siendo *, **, ***, $P < 0,05, 0,01$ y $0,001$, respectivamente. Los valores representan la media \pm el error estándar (n=6 animales).

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

15 Efecto de la adición de *N*-acetilcisteína en las dietas para peces en el incremento de los niveles de glutatión y la actividad GST

Para preparar el pienso de la presente invención se utilizó como base un pienso comercial formulado para la alimentación de anguilas, que está compuesto a base de productos de pescado, aceites y grasas, harina de sangre, productos y subproductos de semillas oleaginosas, subproductos y granos de cereales y minerales. Esta dieta está enriquecida además por vitaminas (Tabla 1). La *N*-acetil-L-cisteína fue añadida a una concentración final de 1,5 g por kilogramo de pienso (0,15%), equivalente a 9,2 mmoles de *N*-acetil-L-cisteína por kg de pienso. Los piensos se fabricaron según el método de extrusión descrito en la patente europea EP0169126 (Process for treating material by extrusion and apparatus for preparing a composite foodstuff; fecha de publicación 1986-01-22). Un pienso control de las mismas características se obtuvo mediante la extrusión del pienso base pero sin la adición de *N*-acetil-L-cisteína. Las dietas se mantuvieron refrigeradas a 4°C o congeladas a -30°C hasta su uso.

TABLA 1

Composición del pienso comercial

Análisis de la composición	%
Proteína Bruta	56
Materias Grasas Brutas	20
Cenizas Brutas	9
Celulosa Bruta	0,9
Aditivos	Por Kg
Vitamina A	10.000 UI
Vitamina D3	1.500 UI
Vitamina E (α -tocoferol)	150 mg

Como animal de estudio se utilizó la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Éstas se obtuvieron con un peso de 5 a 8 g y fueron acondicionadas durante 2 semanas a las condiciones de laboratorio alimentándose con el pienso control. Posteriormente, 200 anguilas se distribuyeron aleatoriamente en dos tanques de 450 L de fibra de vidrio provistos de un circuito semicerrado de recirculación, filtración y calentamiento del agua, para mantener un caudal de agua dulce constante a $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Los tanques disponían de aireación continua, con una cantidad de oxígeno disuelto de $7,6 \pm 0,5$ mg/L. Los peces fueron alimentados durante 6 meses hasta la saciedad dos veces al día de lunes a viernes y una vez durante los fines de semana.

Los niveles de glutatión, tanto total como oxidado, se determinaron según un ensayo colorimétrico sensible y específico (Baker *et al.*, 1990, Anal. Biochem. 190: 360-365). Las actividades enzimáticas se analizaron según Peñallopis *et al.* (2003, Aquat. Toxicol. 65: 337-360). El contenido de proteínas se determinó por el kit de Bio-Rad basado en el procedimiento colorimétrico de Bradford (1976, Anal. Biochem. 72: 248-254), usando albúmina sérica bovina como estándar. El análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores se realizó mediante modelos lineales generales (GLM) multivariantes en el SPSS 11.5, utilizando el peso de los individuos como covariable. Para comparar las medias de los tratamientos correspondientes a un determinado tiempo se utilizaron contrastes *a priori* entre determinados niveles de los factores.

ES 2 249 167 B1

Para estudiar el efecto del pienso enriquecido con NAC, se tomaron muestras al azar de 6 peces de cada uno de los dos tanques al cabo de 1, 3 y 6 meses de alimentar a los animales con las dietas experimentales. Éstos fueron anestesiados en hielo (para que ningún producto químico pudiese interferir con el metabolismo del glutatión) y se les diseccionó el hígado y el músculo, que se almacenaron a -80°C hasta que se realizaron los análisis bioquímicos.

Los peces que fueron alimentados con el pienso suplementado en un 0,15% con *N*-acetilcisteína presentaron unos niveles significativamente mayores de GSH, de la relación GSH/GSSG y de la actividad glutatión *S*-transferasa en el hígado y músculo (Tabla 3). En cambio no se observaron diferencias en el tiempo transcurrido de la alimentación con las dietas experimentales ni con la interacción del tratamiento con NAC y el tiempo de alimentación. El contenido de GSH y el estado redox del glutatión en el hígado y músculo de las anguilas alimentadas con el pienso enriquecido con NAC fue significativamente mayor al cabo del primer mes de alimentación (Tabla 2). La actividad GST del hígado de las anguilas alimentadas con NAC también fue significativamente más alta al cabo del primer mes de alimentación, pero las diferencias con el pienso control en el caso de la actividad GST en el músculo de las anguilas fue significativo al cabo de 6 meses de alimentación.

TABLA 2

Contenido en glutatión reducido (GSH, nmol GSx/mg proteínas), oxidado (GSSG, nmol GSx/mg proteínas), nivel del estado redox del glutatión (GSH/GSSG) y actividad glutatión *S*-transferasa (GST, mU/mg proteínas) en el hígado y músculo de las anguilas alimentadas durante 1, 3 y 6 meses con las dietas experimentales (media \pm error estándar)

	Meses con pienso Ctrl			Meses con pienso NAC		
	1	3	6	1	3	6
Hígado						
GSH	61 \pm 7	67 \pm 5	68 \pm 7	86 \pm 6**	80 \pm 5	84 \pm 8
GSSG	2.8 \pm 0.3	3.2 \pm 0.3	3.0 \pm 0.2	3.2 \pm 0.2	3.3 \pm 0.2	3.3 \pm 0.4
GSH/GSSG	43.1 \pm 1.8	43.1 \pm 3.7	46.2 \pm 3.7	53.8 \pm 4.4*	49.3 \pm 3.8	51.6 \pm 2.3
GST	1203 \pm 74	1272 \pm 98	1253 \pm 57	1489 \pm 87*	1424 \pm 124	1450 \pm 94
Músculo						
GSH	16.5 \pm 0.7	19.5 \pm 1.1	18.9 \pm 1.4	20.7 \pm 1.6*	22.0 \pm 1.6	21.0 \pm 1.7
GSSG	2.0 \pm 0.1	2.1 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2	1.8 \pm 0.1
GSH/GSSG	16.7 \pm 1.1	20.4 \pm 2.6	20.1 \pm 2.4	23.5 \pm 2.6*	25.7 \pm 2.4	23.8 \pm 1.7
GST	27.8 \pm 2.7	30.4 \pm 2.7	27.0 \pm 2.1	33.6 \pm 2.1	35.3 \pm 2.6	35.4 \pm 2.3*

*, **, $P < 0,05$ y $0,01$, respectivamente, según contrastes entre los mismos tiempos en el ANOVA de dos factores.

ES 2 249 167 B1

TABLA 3

Efecto del tratamiento con N-acetilcisteína, el tiempo de alimentación y la interacción tratamiento-tiempo en los niveles de glutatión y actividad glutatión S-transferasa en el hígado y músculo de las anguilas

5

10

15

20

25

		Tratamiento		tiempo		Tr x t	
		F	P	F	P	F	P
Hígado	GSH	13.31	0.0010	0.45	0.45	2.45	0.10
	GSSG	0.59	0.45	0.90	0.90	0.58	0.57
	GSH/GSSG	6.11	0.020	0.28	0.28	0.46	0.64
	GST	9.50	0.004	0.11	0.11	0.19	0.83
Músculo	GSH	4.75	0.038	1.72	1.72	1.74	0.19
	GSSG	1.38	0.25	0.50	0.50	0.02	0.98
	GSH/GSSG	5.94	0.021	0.91	0.91	0.49	0.62
	GST	14.05	0.0008	0.54	0.54	0.67	0.52

Ejemplo 2

30

Efecto de la adición de N-acetilcisteína en las dietas para peces en el incremento de la tolerancia y recuperación al plaguicida azametifós

35

40

En este caso se estudió el efecto de la alimentación de las anguilas con las dietas experimentales en la tolerancia a un tratamiento con un parasiticida. El plaguicida organofosforado azametifós (fosforotioato de S-6-cloro-2,3-dihidro-2-oxo-1,3-oxazol [4,5-b] piridin-3-ilmetil O,O-dimetilo) se administró en forma de Alfacrón® 50 WP (Novartis Sanidad Animal S.L., Barcelona), que consiste en azametifós al 50% en peso. Las anguilas fueron expuestas a 0,1 µg de azametifós por litro de agua (0,1 ppm/L) durante 30 minutos, que es la concentración que normalmente se utiliza en las tareas de desparasitación de los peces. Posteriormente, las anguilas se transfirieron a tanques de 450 L. Seis anguilas de cada grupo de alimentación fueron sacadas de los tanques a las 0, 3, 6, 12, 24 y 96 horas tras la intoxicación con el plaguicida y analizadas como en el Ejemplo 1, salvo que se determinó además la actividad acetilcolinesterasa (AChE) del cerebro, ya que se trata del mejor biomarcador de toxicidad a plaguicidas organofosforados.

45

50

55

60

Los peces que fueron alimentados durante 6 meses con el pienso suplementado en un 0,15% con N-acetil-L-cisteína y expuestos durante 30 minutos a 0,1 ppm/L del parasiticida azametifós presentaron un mayor contenido de GSH y actividad GST en el hígado y músculo que las anguilas alimentadas con el pienso control (Tabla 4). Además, se observó que las anguilas alimentadas con NAC tenían una mayor relación del GSH/GSSG a nivel hepático y especialmente una menor inhibición de la actividad acetilcolinesterasa del cerebro, por lo que presentaban menores síntomas de toxicidad. Mientras que la intoxicación con el plaguicida disminuyó los niveles de GSH en el hígado y músculo (Figuras 1A y 2A), los peces alimentados con NAC mostraron un aumento del contenido en GSH entre las 3 y 6 horas, siendo también significativas las diferencias respecto al GSH hepático de los individuos alimentados con el pienso control a las 12, 48 y 96 h tras la exposición. El estado redox del glutatión en el hígado (Figura 1B) fue significativamente mayor a partir de las 48 h tras la intoxicación, mientras que en el músculo lo fue a las 3 h (Figura 2B). La actividad GST en el hígado de los peces alimentados con NAC aumentó con el tiempo tras la intoxicación, siendo las diferencias significativas a partir de las 48 h (Figura 3A), por lo que se observa un efecto temporal y también una interacción entre el tratamiento con NAC y el tiempo (Tabla 4). La actividad GST en el músculo aumentó significativamente en las anguilas tratadas con NAC a las 3, 48 y 96 h tras la exposición al parasiticida (Figura 3B). La exposición al plaguicida inhibió la actividad acetilcolinesterasa del cerebro, observándose una recuperación con el tiempo (Tabla 4 y Figura 4), que fue mayor en los peces alimentados con NAC, especialmente durante las primeras 3 h tras la intoxicación con el plaguicida y a partir de las 48 h. Así, se observó en estos peces una mayor recuperación de la toxicidad del parasiticida.

65

ES 2 249 167 B1

TABLA 4

Efecto del tratamiento con N-acetil-L-cisteína, el tiempo de recuperación tras la exposición de 30 min a 0,1 ppm de azametifós y la interacción tratamiento-tiempo en los niveles de glutatión y actividades enzimáticas

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

		Tratamiento		tiempo		Tr x t	
		F	P	F	P	F	P
Hígado	GSH	31.81	<0.0001	0.87	0.52	0.76	0.60
	GSSG	0.45	0.50	1.05	0.40	1.35	0.25
	GSH/GSSG	6.70	0.012	0.55	0.77	1.58	0.17
	GST	4.18	0.045	3.94	0.0019	2.37	0.038
Músculo	GSH	12.26	0.0008	0.53	0.78	0.54	0.78
	GSSG	3.91	0.052	1.37	0.24	0.98	0.45
	GSH/GSSG	2.07	0.15	0.77	0.60	1.50	0.19
	GST	11.33	0.0012	0.64	0.70	1.71	0.13
Cerebro	AChE	27.86	<0.0001	2.49	0.031	1.16	0.34

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un aditivo para piensos de peces de cultivo **caracterizado** por estar constituido por *N*-acetilcisteína o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
2. Pienso para peces de cultivo **caracterizado** porque contiene un aditivo para piensos según la reivindicación 1.
- 10 3. Pienso para peces de cultivo según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la *N*-acetilcisteína se incorpora en una cantidad de entre 0,1 y 50 g (de 0,01 a 5%) y más preferentemente de 0,5 y 5 g (de 0,05 a 0,5%) por kilogramo de peso.
- 15 4. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** porque el aditivo para piensos se incorpora en el pienso en forma extrusionada.
5. Pienso según cualquiera de las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** porque el aditivo para piensos se incorpora en el pienso en forma granulada, microencapsulada o pulverizada.
- 20 6. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la alimentación de peces de cultivo.
7. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque aumenta los niveles intracelulares de glutatión de los peces de cultivo.
- 25 8. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque aumenta la destoxificación celular de contaminantes de los peces de cultivo.
9. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque aumenta la tolerancia de los peces de cultivo al estrés oxidativo.
- 30 10. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según la reivindicación 9, **caracterizado** porque aumenta la tolerancia de los peces de cultivo al estrés oxidativo producido por plaguicidas.
11. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque aumenta la resistencia de los peces de cultivo a plaguicidas.
- 35 12. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque favorece la recuperación de los peces de cultivo tras una intoxicación por plaguicidas.
- 40 13. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 12, **caracterizado** porque el plaguicida produce estrés oxidativo y/o una disminución de los niveles de glutatión en los peces de cultivo.
- 45 14. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 13, **caracterizado** porque el plaguicida es un parasiticida usado contra los parásitos que infectan a los peces.
- 50 15. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 14, **caracterizado** porque el plaguicida es un organofosforado y/o piretroide.
16. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 14, **caracterizado** porque el plaguicida es el azametifós.
- 55 17. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 16, **caracterizado** porque se administra concomitantemente o simultáneamente uno o varios plaguicidas.
18. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque el pez de cultivo es la anguila.
- 60 19. Uso de un aditivo para piensos o de un pienso que contiene dicho aditivo según la reivindicación 6, **caracterizado** porque los peces de cultivo son teleósteos, entre otros, el salmón, la trucha, la lubina y la dorada.

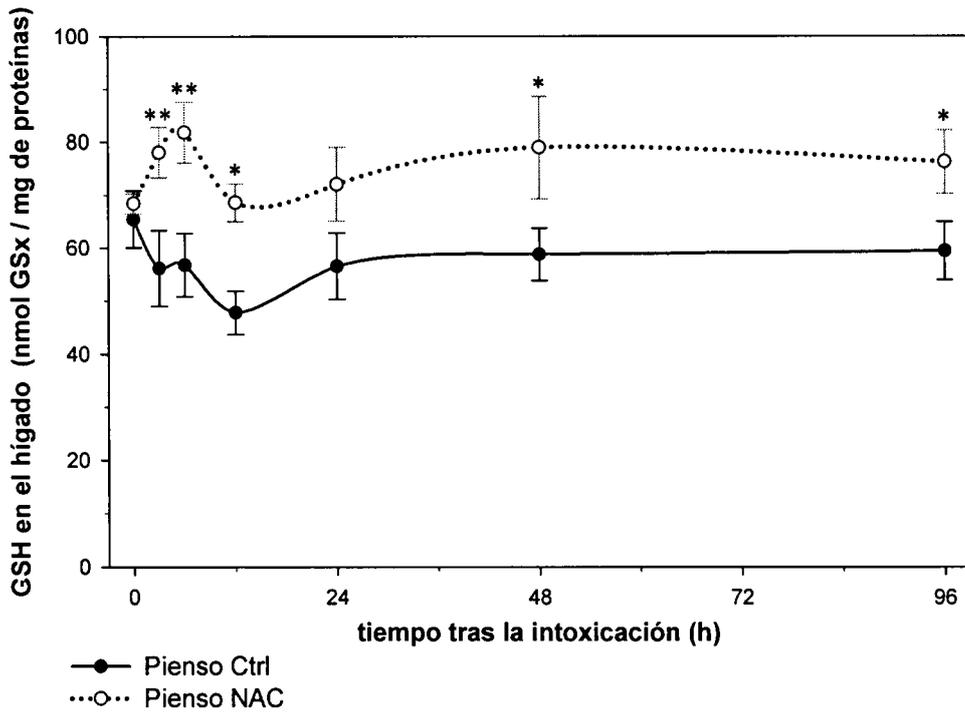


Figura 1A

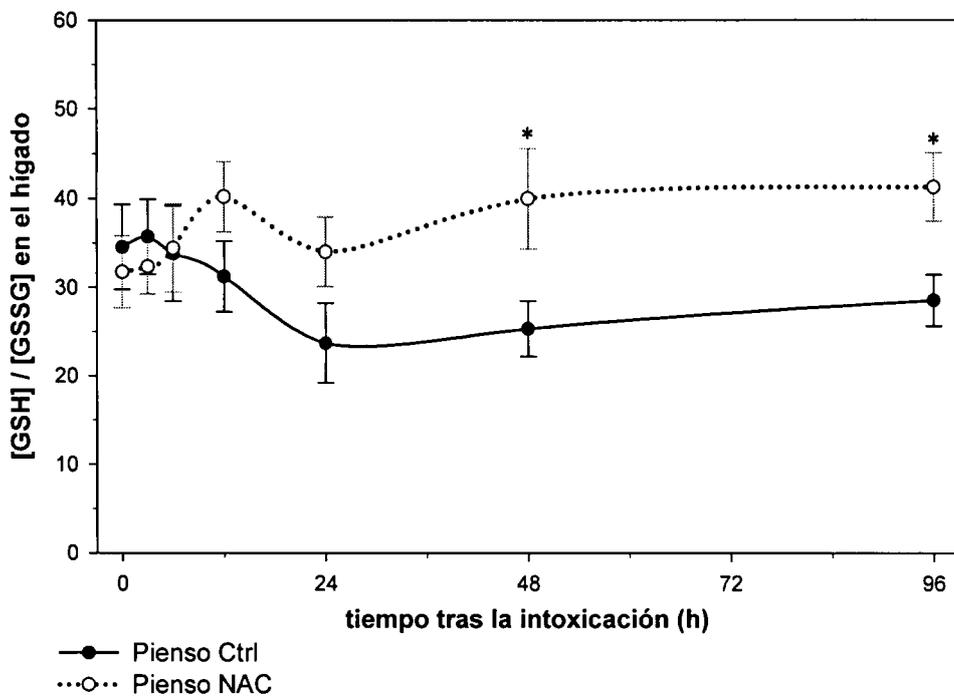


FIGURA 1B

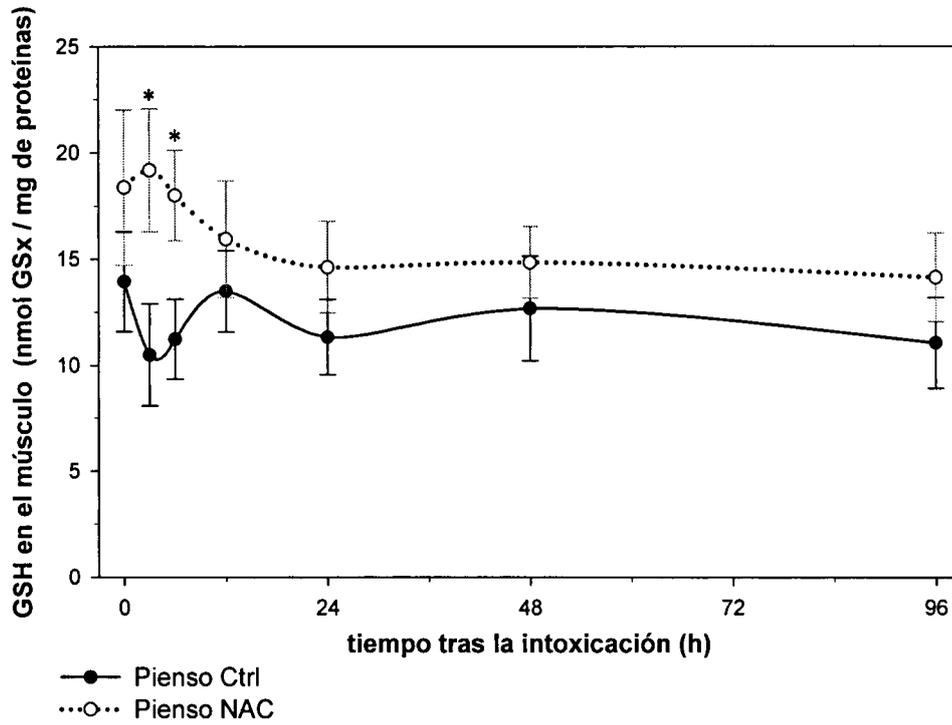


Figura 2A

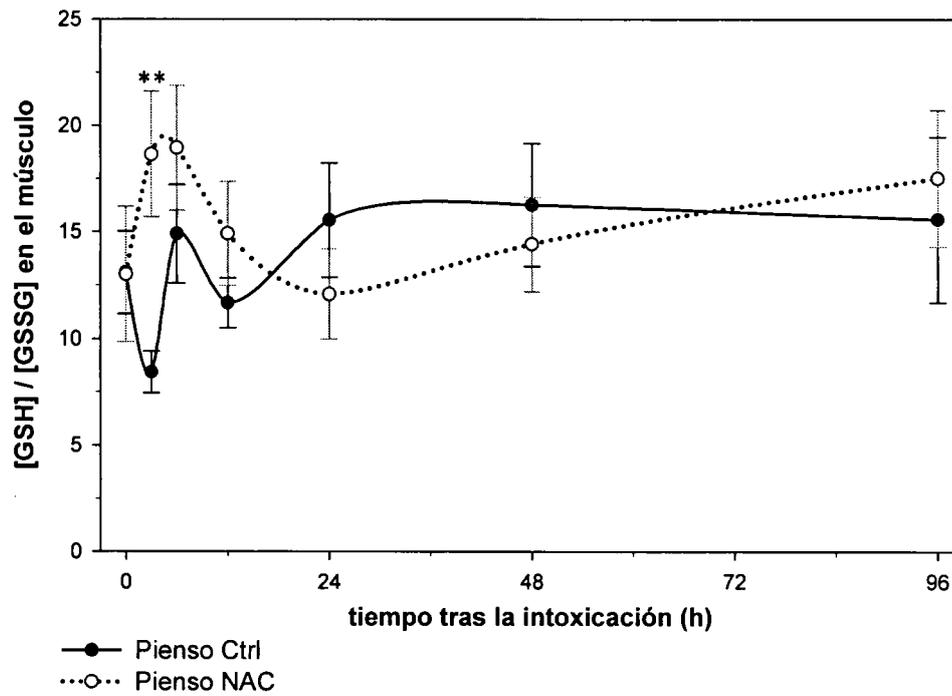


Figura 2B

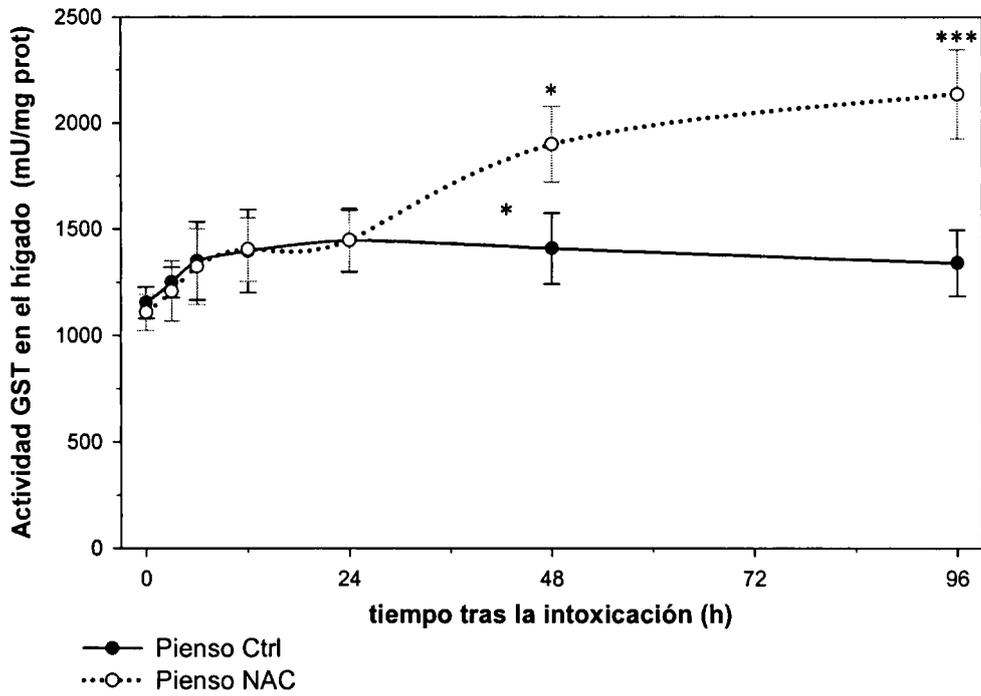


Figura 3A

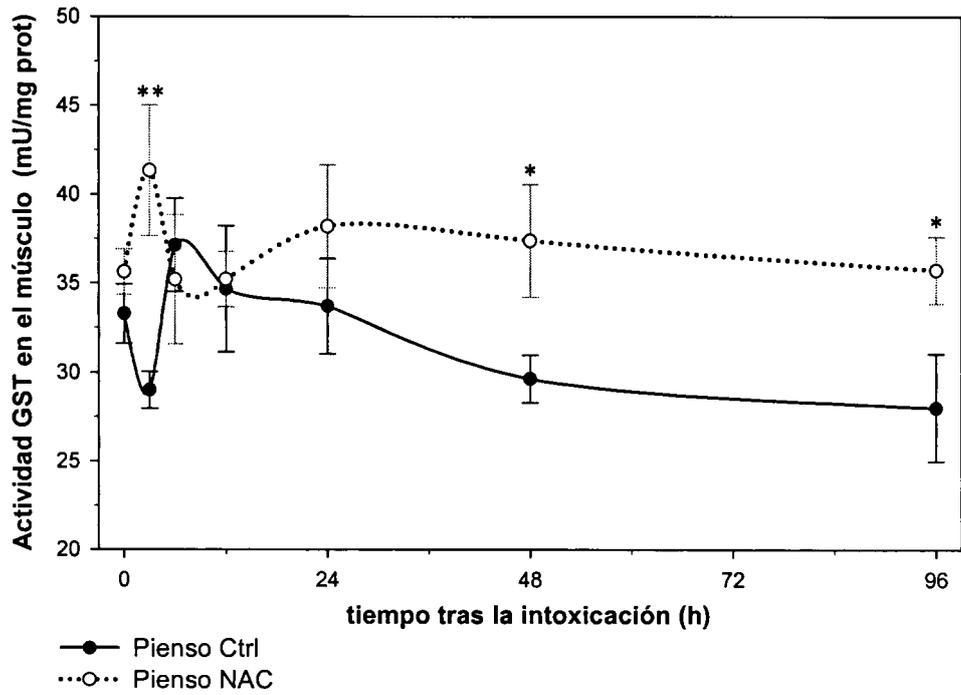


Figura 3B



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 249 167

② Nº de solicitud: 200402118

③ Fecha de presentación de la solicitud: **01.09.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 0158271 A1 (JUVENON INC.) 16.08.2001, reivindicación 1; página 4, líneas 5-9; página 5, líneas 19-25; página 6, líneas 15-25; página 8, líneas 7-33.	1,2,4-7
Y		8-19
Y	PEÑA-LLOPIS, S. et al. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. Aquatic Toxicology, 2003, Vol. 65, páginas 337-360.	8-19
Y	WO 03024487 A1 (NUTRICIA) 27.03.2003, reivindicaciones 14,20,26; página 10, líneas 5-20.	1-19
Y	PEÑA-LLOPIS, S. et al. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels (<i>Anguilla anguilla</i>) by bath treatment with N-acetylcysteine. Dis. Aquat. Org., 2003, Vol. 55, páginas 237-245.	1-19
A	JP 60244262 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 04.12.1985, (resumen) [en línea] [recuperado el 24.10.2005]. Recuperado de EPO WPI DATABASE.	1,2,6,19
A	JP 62232344 A (KYOWA YAKUHIN KK) 12.10.1987, (resumen) [en línea] [recuperado el 24.10.2005]. Recuperado de EPODOC EPO DATABASE.	1,2,6,19
A	EP 399555 A2 (KYOWA HAKKO KOGYO) 28.11.1990, todo el documento.	1,2,5,6,19
A	US 6359008 B1 (GARNETT) 19.03.2002, todo el documento.	1,2,6,19

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	Examinador	Página
26.10.2005	A. Polo Díez	1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61K 31/198 (2006.01)