



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 306 567**

⑫ Número de solicitud: 200600493

⑤① Int. Cl.:
A61K 31/198 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
A01K 61/00 (2006.01)
A23L 1/015 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫② Fecha de presentación: **01.03.2006**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2008**

⑫④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.11.2008

⑦① Solicitante/s:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universitat Jaume I de Castelló**

⑦② Inventor/es: **Peña Llopis, Samuel;
Peña Forner, Juan Bautista y
Serrano Gallego, Roque**

⑦④ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤④ Título: **Método para la destoxificación y depuración de contaminantes orgánicos en moluscos bivalvos y su aplicación.**

⑤⑦ Resumen:

Método para la destoxificación y depuración de contaminantes orgánicos en moluscos bivalvos y su aplicación. La presente invención proporciona el uso de la *N*-acetilcisteína (NAC), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para facilitar la destoxificación y depuración de contaminantes orgánicos en moluscos bivalvos. La NAC es capaz de estimular la síntesis intracelular de glutatión e inducir las actividades glutatión *S*-transferasa y glutatión reductasa en los mejillones, por lo que acelera hasta cuatro veces la velocidad de eliminación de los plaguicidas de los tejidos de los bivalvos al igual que aumentar la tolerancia al estrés oxidativo.

ES 2 306 567 A1

DESCRIPCIÓN

Método para la destoxificación y depuración de contaminantes orgánicos en moluscos bivalvos y su aplicación.

5 Sector de la técnica

Destinado al sector de la acuicultura marina. La presente invención va dirigida al sector de la depuración de moluscos bivalvos cultivados en zonas donde pueda haber problemas de contaminación por contaminantes orgánicos, como los plaguicidas provenientes de zonas agrícolas o piscifactorías de cultivo de salmón, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, furanos y disruptores endocrinos provenientes de zonas industriales y urbanas, y las biotoxinas procedentes de episodios fitoplanctónicos.

Estado de la técnica

Los moluscos bivalvos son unos organismos filtradores que tienden a bioacumular los contaminantes orgánicos del medio. El cultivo de moluscos bivalvos en zonas de poca profundidad del mar y cercanas a zonas urbanas, industriales y/o agrícolas puede provocar la acumulación puntual de contaminantes orgánicos, tales como plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, furanos y disruptores endocrinos en los tejidos de los mismos. El consumo elevado de dichos bivalvos contaminados en los periodos de máxima descarga de contaminantes representa un serio problema de salud pública. La exposición crónica a plaguicidas está asociada a un mayor riesgo de desarrollar cáncer y ciertas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Alavanja *et al.* 2004, Annu. Rev. Public Health 25: 155-197). La exposición crónica a hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas y furanos también representa un mayor riesgo de desarrollar cáncer (Rush-ton 2003, Occup. Environ. Med. 60: 150-156). Los disruptores endocrinos son moléculas ambientales exógenas que pueden afectar la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión, acción y catabolismo de hormonas naturales del organismo. Así, los disruptores endocrinos pueden interactuar con el sistema endocrino de los animales o humanos, deteriorando un número variable de funciones del desarrollo. Por otra parte, los moluscos bivalvos pueden acumular toxinas naturales procedentes de ciertas especies de dinoflagelados o diatomeas de las mareas rojas o afloraciones de microalgas. El consumo de estos bivalvos puede causar efectos neurológicos severos o incluso mortales, tales como las intoxicaciones de tipo amnésico (ASP), diarreico (DSP), neurotóxico (NSP) y paralítico (PSP) (Isbister y Kiernan 2005, Lancet Neurol. 4: 219-228).

Los métodos actuales de depuración de moluscos bivalvos como los mejillones, ostras, almejas, berberechos, chirlas y pectínidos (tales como vieiras, volandeiras y zamburiñas) consisten en el tratamiento con agua filtrada y esterilizada o mediante presión hidrostática a altas temperaturas para eliminar bacterias y otros microorganismos patógenos de los tejidos de los bivalvos, tal y como se describe en las patentes US5249548 (Shellfish depuration system; fecha de publicación: 1993-10-05), US5482726A (Method for reducing contamination of shellfish; 1996-01-09) y US6537601 (Process of elimination of bacteria in shellfish and of shucking shellfish; 2003-03-25). Normalmente esta depuración es de 48 h. Sin embargo, la depuración o eliminación de compuestos orgánicos de los moluscos bivalvos depende además de las características naturales de cada especie, por lo que la depuración convencional quizás no sea suficiente para eliminar totalmente los contaminantes de sus tejidos. De hecho se ha observado que los plaguicidas necesitan varios días para eliminarse totalmente de los tejidos de los bivalvos (Serrano *et al.* 1997, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33: 47-52), por lo que estas 48 h podrían ser insuficientes. Además, en la depuración convencional no se emplea un tratamiento farmacológico, ya que de hecho no existe en el mercado un compuesto que sea útil para eliminar contaminantes orgánicos en moluscos bivalvos.

Estudios previos demostraron que el antioxidante y precursor de la síntesis de glutatión *N*-acetilcisteína (en adelante, NAC) administrado en baños terapéuticos acelera la recuperación de los peces intoxicados con una concentración subletal de un plaguicida organofosforado (Peña-Llopis *et al.* 2003, Dis. Aquat. Organ. 55: 237-245). Además, según la patente española EP200402118 (Aditivo para piensos y pienso que contiene dicho aditivo para tratar y prevenir el estrés oxidativo y la toxicidad de los tratamientos parasiticidas, pendiente), la NAC utilizada como aditivo de piensos para peces de cultivo permite contrarrestar el estrés oxidativo y la toxicidad ocasionada por los tratamientos con plaguicidas utilizados en la eliminación de los parásitos de los teleósteos. La NAC es un derivado aminoacídico que 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 (GSH). El glutatión 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 destoxificación 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 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. El estrés oxidativo se produce cuando existe un desequilibrio entre la generación de radicales libres y su eliminación por parte de los antioxidantes celulares y se caracteriza por la inactivación de proteínas (y por tanto de enzimas), peroxidación de los lípidos de membrana y daños en el ADN. 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 o GSH. 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.

No obstante, la utilización de la NAC en animales invertebrados no ha sido estudiada hasta la actualidad. Así, la presente invención describe la aceleración de la eliminación de contaminantes orgánicos en los tejidos de los bivalvos mediante la administración de *N*-acetilcisteína durante la etapa de depuración, lo que abre la perspectiva de nuevos tratamientos depurativos.

Descripción de la invención

- Descripción breve

Un objeto de la presente invención consiste en un compuesto precursor de la síntesis intracelular de glutatión caracterizado porque es útil en la destoxificación de contaminantes orgánicos durante el proceso de depuración de moluscos bivalvos en agua de mar.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el que el precursor de la síntesis intracelular de glutatión pertenece, a título ilustrativo y sin que limite dicho alcance, al siguiente grupo: *N*-acetilcisteína, 2-oxotiazolidina-4-carboxilato (Wu *et al.* 2004; J. Nutr. 134: 489-492), ácido α -lipoico, ácido dihidrolipoico, ésteres de cisteína y glutatión, metionina, taurina, *N*-(2-mercaptopropionil)glicina (Atmaca 2004; Yonsei Med. J. 45: 776-788), melatonina (Urata *et al.* 1999; Free Radic. Biol. Med. 27: 838-847) y sus derivados o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto precursor de la síntesis intracelular de glutatión para la fabricación de un medicamento útil en la destoxificación de contaminantes orgánicos durante el proceso de depuración de moluscos bivalvos.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el hecho de que los contaminantes orgánicos pertenecen, a título ilustrativo y sin que limite dicho alcance, a alguno de los siguientes grupos: plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, furanos, disruptores endocrinos y toxinas procedentes de episodios fitoplanctónicos, tales como el ácido domoico (ASP), ácido okadaico (DSP), brevetoxinas (NSP) y la saxitoxina y gonyautoxinas (PSP).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el hecho de que el contaminante orgánico es un plaguicida organofosforado, y más preferentemente el fenitrotión. Otros plaguicidas organofosforados a destacar son los organofosfatos diclorvos, clorfenvinfós y glifosato y los organotiofosfatos azametifós, malatión, clorpirifós, diazinón, metidatión, paratión y metil paratión.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión caracterizado por incrementar los niveles intracelulares de glutatión en los moluscos de cultivo.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión caracterizado por inducir la actividad glutatión *S*-transferasa en los moluscos de cultivo, lo que aumenta la capacidad de destoxificación de contaminantes orgánicos.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión caracterizado por inducir la actividad glutatión reductasa en los moluscos de cultivo, lo que aumenta la tolerancia al estrés oxidativo.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el desarrollo de una composición farmacéutica para el tratamiento de la contaminación marina en moluscos bivalvos, caracterizada por la adición de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión.

- Descripción detallada

La presente invención se basa en que los inventores han descubierto, sorprendentemente, que la administración de NAC en la etapa de depuración duplica e incluso cuadriplica la velocidad de eliminación y destoxificación de compuestos orgánicos - por ejemplo, plaguicidas - en los tejidos de los moluscos bivalvos. Esto es así ya que los inventores han tenido éxito en desentrañar que el tratamiento con NAC de la presente invención aumenta la síntesis intracelular de glutatión en la glándula digestiva de los mejillones - a pesar que dicha síntesis está regulada por retroalimentación negativa, en la que el exceso de GSH inhibe su síntesis (Richman y Meister 1975, J. Biol. Chem. 250: 1422-1426) - en concentraciones y en tiempo adecuadas para llevar a cabo una función depurativa y de destoxificación celular de los compuestos orgánicos. Además, en paralelo con esto los inventores han identificado que la depuración con NAC es capaz de inducir la actividad glutatión reductasa (GR) y glutatión *S*-transferasa (GST) en la glándula digestiva de los moluscos de cultivo. El incremento en la actividad GR facilita la reducción de GSSG a

GSH, aumentando la relación GSH/GSSG, y por tanto, proporciona una mayor tolerancia de los moluscos de cultivo al estrés oxidativo. Las GSTs catalizan la conjugación del GSH con compuestos apolares que contienen un átomo de carbono, nitrógeno o azufre electrófilo. Esto permite la destoxificación de xenobióticos, principalmente carcinógenos químicos y contaminantes ambientales, incluyendo a los plaguicidas (como los herbicidas acroleína y atrazina, los insecticidas organoclorados DDT y lindano y los insecticidas organofosforados malatión y metil paratión), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (como los epóxidos diólicos producidos a partir del criseno, metilcriseno, benzo[c]criseno, benzo[g]criseno, benzo[c]fenantreno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno y dibenzo[a,l]pireno) y otros contaminantes como el arsénico inorgánico, además de la inactivación de productos endógenos del estrés oxidativo, tales como aldehídos α,β -insaturados, quinonas, epóxidos e hidroperóxidos) (Hayes *et al.* 2005, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45: 51-88). Las GSTs también catalizan la destoxificación dependiente de GSH de otros contaminantes orgánicos, como los bifenilos policlorados (PCBs) (Lee *et al.* 2005, Toxicol Lett. 157: 139-149), dioxinas (como la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina [Machala *et al.* 1998, Ecotoxicol. Environ. Saf. 41: 107-111]), furanos (como el 4-ipomeanol [Boyd 1981, Adv. Exp. Med. Biol. 136: 865-879]), disruptores endocrinos (como el bisfenol A, Zeranól, 17 β -oestradiol, dietilestilboestrol y genisteína [Leffers *et al.* 2001, Hum. Reprod. 16: 1037-1045; Nishizawa *et al.* 2005, J. Reprod. Dev. 51: 593-605]) y las biotoxinas procedentes de episodios fitoplactónicos (como el ácido domoico, causante de las intoxicaciones de tipo amnésico [Bard 2000, Aquat. Toxicol. 48: 357-389]; el ácido okadaico, causante de las intoxicaciones de tipo diarreico [Ainbinder *et al.* 1997, Eur. J. Biochem. 243: 49-57]; las brevetoxinas, causantes de las intoxicaciones de tipo neurotóxico [Radwan *et al.* 2005, Toxicol. Sciences 85: 839-846] y la saxitoxina y gonyautoxinas, causantes de las intoxicaciones de tipo paralítico [Gubbins *et al.* 2001, Harmful Algal Blooms 2000: 387-390]). En general las GSTs metabolizan a muchos compuestos endógenos y extraños que estimulan la expresión de una batería de genes destoxificantes (tales como el citocromo P-450 y las GSTs) a través de elementos de respuesta a electrófilos o antioxidantes (ARE) y/o por unión del xenobiótico al receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) (Hayes *et al.* 2005, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45: 51-88). Por lo tanto, la inducción de la actividad GST junto a niveles más altos de GSH permitiría acelerar la destoxificación de una gran variedad de contaminantes orgánicos con mayor eficacia, en especial fenitrotión (Ejemplo 2).

En este mismo sentido, la depuración de los mejillones llevada a cabo en la presente invención tras la exposición de fenitrotión fue mayor en los tratados con NAC, mientras que el tiempo de vida medio del plaguicida en los tejidos de los mejillones ($t_{1/2}$) se redujo drásticamente y se incrementó la velocidad de eliminación del fenitrotión de los tejidos de los mejillones con respecto a los animales en los que la depuración se llevó a cabo únicamente con agua de mar (Ejemplo 2). Esto posibilita la utilización de la NAC para facilitar y acelerar la eliminación de contaminantes orgánicos de los tejidos de los moluscos bivalvos de cultivo. De esta manera, teniendo en cuenta que la etapa de depuración de los moluscos bivalvos no sobrepasa las 48 h, el tratamiento con NAC garantiza que en el caso más extremo de contaminación de los mejillones se producirá la destoxificación total de los plaguicidas durante dicho periodo.

Así, un objeto de la presente invención lo constituye un método para la destoxificación y depuración de contaminantes orgánicos en moluscos bivalvos, en adelante método de la invención, caracterizado porque durante el proceso de depuración de los moluscos en un baño terapéutico de agua de mar se incorpora a ésta un precursor de la síntesis intracelular de glutatión.

Un objeto particular de la presente invención lo constituye el método de la invención en el que el precursor de la síntesis intracelular de glutatión pertenece, a título ilustrativo y sin que limite dicho alcance, al siguiente grupo: *N*-acetilcisteína, 2-oxotiazolidina-4-carboxilato (Wu *et al.* 2004; J. Nutr. 134: 489-492), ácido α -lipoico, ácido dihidrolipoico, ésteres de cisteína y glutatión, metionina, taurina, *N*-(2-mercaptopropionil)glicina (Atmaca 2004; Yonsei Med. J. 45: 776-788), melatonina (Urata *et al.* 1999; Free Radic. Biol. Med. 27: 838-847) y sus derivados o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Una realización particular de la presente invención lo constituye el método de la invención en el que el precursor de la síntesis intracelular de glutatión es la *N*-acetilcisteína o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, y que se incorpora en una cantidad al agua de mar de baño entre 0,001 y 10 g (de 0,00001 a 0,1%) por litro y más preferentemente de entre 50 y 250 mg (de 0,0005 a 0,0025%) por litro. Estos rangos de concentración son lo suficientemente amplios para permitir los efectos deseados sin llegar a ser tóxicos para los moluscos bivalvos.

El fármaco 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.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el método de la invención en el que los contaminantes orgánicos pertenecen, a título ilustrativo y sin que limite dicho alcance, a alguno de los siguientes grupos: plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, furanos, disruptores endocrinos y toxinas procedentes de episodios fitoplactónicos, tales como el ácido domoico (ASP), ácido okadaico (DSP), brevetoxinas (NSP) y la saxitoxina y gonyautoxinas (PSP).

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el método de la invención en el que el contaminante orgánico es un plaguicida organofosforado, y más preferentemente el fenitrotión. Otros plaguicidas organofosforados a destacar son los organofosfatos diclorvós, clorfenvífós y glifosato y los organotiofosfatos azametífós, malatión, clorpirífós, diazinón, metidatión, paratión y metil paratión.

La presente invención es aplicable a cualquier tipo de molusco bivalvo en cuyo cultivo se presenten problemas de contaminación por contaminantes orgánicos y/o estrés oxidativo. Así, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el método de la invención en el que el molusco bivalvo de cultivo, a título ilustrativo y sin que limite la presente invención, es un molusco perteneciente al siguiente grupo: mejillón, ostra, ostrón, almeja, chirla, berberecho, coquina y pectínidos como la viera, volandeira y zamburiña. Una realización particular de la presente invención lo constituye el método de la invención en el que el precursor de la síntesis intracelular de glutatión es la *N*-acetilcisteína y el molusco bivalvo es el mejillón.

Otro objeto de la presente invención es el uso del método de la invención en un proceso de depuración y destoxificación de compuestos orgánicos en moluscos bivalvos.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión caracterizado por incrementar los niveles intracelulares de glutatión en los moluscos de cultivo.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión caracterizado por inducir la actividad glutatión *S*-transferasa en los moluscos de cultivo, lo que aumenta la capacidad de destoxificación de contaminantes orgánicos.

Finalmente, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión caracterizado por inducir la actividad glutatión reductasa en los moluscos de cultivo, lo que aumenta la tolerancia al estrés oxidativo.

Breve descripción del contenido de las figuras

Figura 1 - Perfil de bioacumulación de fenitrotión en tejidos del mejillón para una concentración nominal de 0,2 mg/L de plaguicida en el agua de mar. Esta figura indica que a partir del quinto día de exposición se llega al estado estacionario en la bioconcentración del plaguicida.

Figura 2 - Perfil de depuración de fenitrotión en mejillón con las distintas concentraciones de *N*-acetilcisteína utilizadas. Esta Figura indica la relación dosis-efecto de la NAC, por lo que a mayor concentración de NAC, mayor es la eliminación de plaguicidas de los tejidos de los bivalvos.

Figuras 3A, 3B y 3C - Contenido en glutatión reducido (GSH) (3A), oxidado (GSSG) (3B) y nivel del estado redox del glutatión (GSH/GSSG) (3C) en la glándula digestiva de los mejillones expuestos durante 20 días a 0,2 mg/L de fenitrotión y depurados con diferentes concentraciones de NAC. Estas Figuras muestran un incremento de la concentración de GSH durante las primeras 48 h en la glándula digestiva de los moluscos tratados con NAC, especialmente con 250 mg/L. La concentración de GSSG disminuye con el tiempo de depuración, por lo que la relación GSH/GSSG aumenta entre las 24 y 96 h de depuración. Los asteriscos expresan las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo según los contrastes dentro del ANOVA de tres factores, siendo *, **, *** $P < 0,05$, y 0,001 respectivamente. Los valores representan la media \pm el error estándar ($n=6$ animales).

Figuras 4A y 4B - Actividad glutatión reductasa (GR) (4A) y glutatión *S*-transferasa (GST) (4B) en la glándula digestiva de los mejillones expuestos durante 20 días a 0,2 mg/L de fenitrotión y depurados con diferentes concentraciones de NAC. Estas Figuras muestran que la depuración con NAC induce la actividad GR y GST en la glándula digestiva de los mejillones, siendo especialmente significativo para una concentración de 250 mg/L de NAC. Por lo tanto, los animales tratados con NAC presentan una mayor capacidad de regenerar GSH y destoxificar xenobióticos. Los asteriscos expresan las diferencias significativas entre tratamientos para un mismo tiempo según los contrastes dentro del ANOVA de tres 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

Bioacumulación de fenitrotión en los tejidos de los mejillones

Cuatrocientos veinte mejillones se distribuyeron aleatoriamente en cuatro tanques de 150 L de fibra de vidrio. La mitad se expusieron durante 20 días a una concentración nominal de 0,2 mg/L de fenitrotión técnico (96%) (*O,O*-dimetil *O*-[3-metil-4-nitrofenol] fosforotiató), con renovación cada 48 h del agua, plaguicida y microalgas (*Tetraselmis suecica*). El fenitrotión es un insecticida fenil organotiofosfato, al igual que el fentión, paratión y metil-paratión. La concentración de fenitrotión utilizada corresponde con la máxima registrada en el Delta del Ebro (de 119 a 178 $\mu\text{g/L}$; Oubiña *et al.* 1996, Environ. Sci. Technol. 30: 3551-3557). La otra mitad de los mejillones se expusieron a 2,9 $\mu\text{L/L}$ de acetona, que fue la concentración utilizada para disolver el fenitrotión. La cantidad de fenitrotión analizada en el agua de mar en cada renovación del plaguicida fue de $213 \pm 15 \mu\text{g/L}$, lo que muestra una gran concordancia con las concentraciones nominales. Al cabo de 1, 3, 7, 13 y 20 días de exposición se sacaron 5 mejillones de cada tanque. A 2 animales se les analizó el contenido total de fenitrotión mientras que a los otros 3 individuos se les extrajo la glándula digestiva para determinar los niveles de glutatión y actividades enzimáticas.

La determinación de fenitrotión en agua se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas según el método desarrollado por Hernández *et al.* (1993, *Chromatographia* 37: 303-312). La recuperación del fenitrotión a nivel de 200 ng/ml fue del 85±5%. El límite de detección (LOD) fue de 0.1 ng/ml. Para la determinación de fenitrotión en tejidos de moluscos se aplicó el método desarrollado por Hernández *et al.* (1998, *Chromatographia* 42: 151-158). Las recuperaciones obtenidas en muestras fortificadas a nivel de 400 y 40 ng/g fueron del 89±9% y 95±7%, respectivamente. Los límites de cuantificación (LOQ) y de detección (LOD) fueron 10 ng/g y 1 ng/g, respectivamente. El control de calidad del análisis se realizó utilizando un patrón interno de fenitrotión marcado con deuterio (fenitrotión (*O,O*-dimetil- d_6)).

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 Peña-Llopis *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 y tres factores se realizó mediante modelos lineales generales (GLM) multivariantes en el SPSS 12. Para comparar las medias de los tratamientos correspondientes a un determinado tiempo se utilizaron contrastes *a priori* entre determinados niveles de los factores.

TABLA 1

Cantidad de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), la relación entre ambos (GSH/GSSG) y las actividades glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) en la glándula digestiva de los mejillones expuestos durante 20 días a 213±15 µg/L de fenitrotión (F) o su disolvente, acetona (A)

		tiempo de exposición (días)				
		1	3	7	13	20
GSH	A	58,7 ± 3,9	59,3 ± 4,8	56,4 ± 3,3	63,2 ± 2,4	65,3 ± 3,8
		45,9 ± 2,6*	46,8 ± 5,3*	43,2 ± 4,1*	63,9 ± 4,6	71,6 ± 3,3
	F					
GSSG	A	10,3 ± 0,7	10,0 ± 0,6	9,2 ± 0,5	9,8 ± 0,4	10,2 ± 0,5
		11,9 ± 1,1	9,6 ± 0,8	8,9 ± 0,5	12,5 ± 0,5**	12,8 ± 0,8**
	F					
GSH/GSSG	A	11,5 ± 0,5	11,9 ± 0,9	12,5 ± 1,0	12,9 ± 0,5	12,9 ± 0,6
		8,1 ± 0,8**	9,7 ± 0,7*	9,7 ± 0,8*	10,3 ± 0,9*	11,3 ± 0,4
	F					
GR	A	20,7 ± 1,3	21,4 ± 1,1	22,8 ± 1,1	23,7 ± 1,6	22,9 ± 1,5
		16,0 ± 0,6**	18,0 ± 1,3*	17,5 ± 0,8**	20,2 ± 1,1*	19,1 ± 1,3*
	F					
GST	A	105,8 ± 7,4	103,8 ± 6,2	107,0 ± 11,3	107,3 ± 7,6	112,2 ± 6,3
		90,0 ± 2,3	91,6 ± 5,9	92,4 ± 7,2	97,3 ± 6,1	90,5 ± 5,4*
	F					

TABLA 2

Efecto de la exposición al fenitrotión, el tiempo de exposición y la interacción exposición-tiempo en los niveles de glutatión y actividades glutatión reductasa y glutatión S-transferasa en la glándula digestiva de los mejillones

	Exposición		tiempo		Exp x t	
	F	P	F	P	F	P
GSH	6,42	0,014	8,56	<0,001	2,75	0,038
GSSG	8,75	0,005	4,94	0,0020	2,63	0,045
GSH/GSSG	27,66	<0,001	2,71	0,040	0,40	0,81
GR	31,03	<0,001	2,62	0,046	0,24	0,92
GST	11,55	0,0013	0,18	0,95	0,20	0,93

La exposición de los mejillones a 0,2 mg/L de fenitrotión durante 20 días produjo una bioacumulación de este plaguicida en los tejidos de los bivalvos. Los datos de la concentración de plaguicida en los mejillones (C_m) se ajustaron a una cinética de primer orden según Serrano *et al.* (1997, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33, 47-52). Tras aproximadamente 5 días de exposición se alcanzó una condición de estado estacionario en la bioconcentración (Figura 1), obteniéndose un factor de bioconcentración (FBC) de 9.2 ± 1.5 ml/g peso húmedo.

Los efectos globales de la exposición al plaguicida sobre los bivalvos fueron una disminución y oxidación de los niveles de glutatión y una inhibición de las actividades GR y GST en la glándula digestiva (Tabla 2). Salvo la GST, los demás parámetros presentaron un componente temporal, al aumentar con el tiempo de exposición. Además, se observó para los niveles de GSH y GSSG una interacción entre la exposición al plaguicida y el tiempo de exposición. En concreto, los moluscos intoxicados mostraron una disminución del contenido en GSH durante los 7 primeros días y un subsiguiente aumento de GSSG desde el día 13 a 20 (Tabla 1). Esto se vio reflejado en una importante oxidación de los niveles de glutatión durante los 13 primeros días de exposición al plaguicida. El fenitrotión provocó una significativa inhibición de la actividad GR durante toda la exposición y de la actividad GST al cabo de 20 días.

Ejemplo 2

Efecto de la N-acetilcisteína en la destoxicación y depuración de contaminantes orgánicos de los moluscos

Cuatrocientos veinte mejillones se expusieron durante 20 días a una concentración nominal de 0,2 mg/L de fenitrotión técnico (96%) o a 2,9 μ L/L de acetona tal y como se explica en el ejemplo 1. Posteriormente, estos mejillones fueron distribuidos aleatoriamente en acuarios de 40 L con agua de mar esterilizada por luz ultravioleta que contenía 0, 50 ó 250 mg/L de NAC (por duplicado). De esta manera se estudió el efecto de la depuración tras la intoxicación en agua de mar o en dos concentraciones de NAC. Al cabo de 8, 24, 48, 96 y 168 h de depuración se sacaron 10 mejillones de cada tratamiento. A 4 animales se les analizó el contenido en fenitrotión en sus tejidos mientras que a los otros 6 individuos se les extrajo la glándula digestiva para determinar los niveles de glutatión y actividades enzimáticas.

TABLA 3

Parámetros toxicocinéticos de la depuración del plaguicida

[NAC] (mg/L)	k_2 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	t_{99} (h)	% tras 24 h	% tras 48 h
0	$0,036 \pm 0,005$	$19,6 \pm 2,7$	130 ± 18	$42,5 \pm 5,0$	$18,2 \pm 4,2$
	0,0694	9,99	66,4	18,9	3,58
50	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0,0003	0,05	0,3	0,2	0,06
250	$0,132 \pm 0,014$	$5,3 \pm 0,5$	$35,1 \pm 3,6$	$4,3 \pm 1,4$	$0,20 \pm 0,12$

ES 2 306 567 A1

TABLA 4

Cantidad de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), la relación entre ambos (GSH/GSSG) y las actividades glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) en la glándula digestiva de los mejillones expuestos durante 20 días a acetona y tratados con 0, 50 ó 250 mg/L de NAC

	NAC	tiempo de tratamiento con NAC (horas)				
		8	24	48	96	168
GSH	0	63,9	63,3	55,8	58,8	54,1
		±	±	±	±	±
		3,5	4,3	1,9	3,2	5,2
	50	69,5	69,7	63,2	56,0	57,5
		±	±	±	±	±
		4,9	5,4	2,0	4,9	4,8
	250	75,4	80,5	81,8	68,3	70,9
		±	±	±	±	±
		1,2	5,0*	4,4***	5,2	4,3*
GSSG	0	9,9	9,2	8,7	9,7	9,8
		±	±	±	±	±
		0,7	0,4	0,2	0,6	0,3
	50	9,4	9,4	8,9	8,2	8,3
		±	±	±	±	±
		0,4	0,5	0,4	0,6	0,3
	250	8,2	7,7	8,9	10,4	10,5
		±	±	±	±	±
		0,3	0,5	0,6	0,4	0,6
GSH/GSSG	0	13,1	13,8	12,9	12,3	11,0
		±	±	±	±	±
		0,7	0,8	0,5	0,6	1,0
	50	14,8	14,9	14,3	13,7	13,9
		±	±	±	±	±
		0,8	0,7	0,5	0,5	1,2
	250	18,6	21,3	19,1	13,2	13,7
		±	±	±	±	±
		0,6***	1,9***	2,0***	1,0	1,1
GR	0	21,3	22,8	22,1	22,2	20,6
		±	±	±	±	±
		1,1	1,0	1,2	1,4	0,7
	50	25,6	26,4	24,7	23,6	24,6
		±	±	±	±	±
		1,8*	1,8	1,3	1,6	0,8*
	250	27,5	24,6	23,4	25,3	26,9
		±	±	±	±	±
		1,2**	1,2	1,4	1,8	0,5**
GST	0	108	105	108	98	110
		±	±	±	±	±
		8	6	6	5	5
	50	114	109	116	115	122
		±	±	±	±	±
		7	9	4	11	10
	250	113	114	135	142	142
		±	±	±	±	±
		7	8	6*	6***	6**

TABLA 5

Efecto de la exposición al fenitrotión, el tratamiento con diferentes concentraciones de NAC y tiempo de depuración en los niveles de glutatión y actividades glutatión reductasa y glutatión \underline{S} -transferasa en la glándula digestiva de los mejillones

	Exposición		Tratamiento		tiempo	
	F	P	F	P	F	P
GSH	21,30	<0,001	18,23	<0,001	5,00	<0,001
GSSG	75,52	<0,001	1,05	0,35	2,12	0,08
GSH/GSSG	14,19	<0,001	40,90	<0,001	4,81	0,0011
GR	0,66	0,42	28,03	<0,001	1,36	0,25
GST	2,03	0,16	47,03	<0,001	2,59	0,039

TABLA 6

Efecto de la interacción de la exposición al fenitrotión con la concentración de NAC en el tratamiento (Exp x Tr), la interacción de la exposición al plaguicida con el tiempo de depuración (Exp x t), la interacción del tratamiento con NAC con el tiempo de depuración (Tr x t) y la interacción de los tres factores en los niveles de glutatión y actividades glutatión reductasa y glutatión \underline{S} -transferasa en la glándula digestiva de los mejillones

	Exp x Tr		Exp x t		Tr x t		Exp x Tr x t	
	F	P	F	P	F	P	F	P
GSH	2,81	0,06	0,13	0,97	1,72	0,10	0,66	0,73
GSSG	1,39	0,25	5,94	<0,001	1,92	0,06	1,46	0,18
GSH/GSSG	3,47	0,034	6,11	<0,001	2,29	0,024	1,81	0,08
GR	2,36	0,10	1,84	0,12	0,40	0,92	2,07	0,042
GST	5,07	0,007	1,00	0,41	0,81	0,60	0,52	0,84

La depuración de los mejillones tras 20 días de exposición a 0,2 mg/L de fenitrotión fue mayor en los tratados con NAC. La constante de depuración k_2 se duplicó en los bivalvos depurados con 50 mg/L de NAC y se cuadruplicó en los tratados con 250 mg/L de NAC, por lo que el tiempo de vida medio del plaguicida en los tejidos de los mejillones ($t_{1/2}$) se redujo a la mitad y a una cuarta parte, respectivamente (Tabla 3). Por lo tanto, el tratamiento con 50 y 250 mg/L de NAC duplicó y cuadruplicó, respectivamente, la velocidad de eliminación del fenitrotión de los tejidos de los mejillones. Así, mientras que los mejillones depurados en agua de mar esterilizada necesitarían 130 h para eliminar el 99% del plaguicida de sus tejidos, los tratados con 50 mg/L de NAC necesitarían 66 h y los depurados con 250 mg/L de NAC sólo requerirían 35 h (Tabla 3, Figura 2). Mientras tras 24 h de depuración en agua de mar permanecería el 43% del plaguicida en los bivalvos, en los tratados con 50 y 250 mg/L de NAC lo haría un 18.9 y 4.3%, respectivamente, lo que supone unas concentraciones entre 2 y 10 veces inferiores. Tras 48 h de depuración, la concentración remanente de plaguicida en los mejillones depurados únicamente con agua sería un 18.2%. Esta concentración sería 5 y 93 veces mayor que la presentada por los animales depurados con 50 y 250 mg/L de NAC (3.6 y 0.2%), respectivamente (Tabla 3). Esto garantiza que tratando a los moluscos bivalvos con 250 mg/L de NAC se eliminan todos los plaguicidas dentro de las 48 horas necesarias para la depuración.

Los efectos globales de la depuración indican un aumento del contenido de GSH y especialmente de GSSG en la glándula digestiva, que disminuye el estado redox del glutatión en los mejillones expuestos al plaguicida (Tabla 5). Por el contrario, el tratamiento con NAC induce la síntesis intracelular de GSH manteniendo los niveles de GSSG, por lo que aumenta drásticamente la relación GSH/GSSG. Las actividades GR y GST también se inducen enormemente por el tratamiento con NAC. El tiempo de depuración influyó en los niveles de GSH y del estado redox del glutatión y en menor medida en la actividad GST. Por otra parte, el glutatión oxidado presentó una interacción de la exposición

al plaguicida con el tiempo de depuración (Tabla 6). Esta interacción también se observó en los niveles del estado redox del glutatión, además de una interacción entre la exposición al fenitrotión y el tratamiento con NAC y entre el tratamiento con NAC y el tiempo de depuración. La actividad GR presentó una interacción entre los 3 factores estudiados y la actividad GST una interacción entre la exposición al fenitrotión y el tratamiento con NAC.

Los mejillones controles que fueron expuestos a acetona durante 20 días y luego depurados con 250 mg/L de NAC (Tabla 4) aumentaron el contenido de GSH entre las 24 y 48 h, el estado redox del glutatión durante las primeras 48 h y a los 7 días, y estimularon la actividad GR a las 8 y 168 h y la actividad GST a partir de las 48 h. Por otra parte, los animales que fueron expuestos al plaguicida organofosforado durante 20 días y luego depurados con NAC, aumentaron los niveles de GSH a lo largo de las primeras 48 h (Figura 3A). El GSSG disminuyó con el tiempo (Figura 3B), incrementando el estado redox del glutatión entre las 24 y 96 h de depuración (Figura 3C). La actividad GR fue mayor en los mejillones depurados con NAC durante las 24 y 48 h (Figura 4A), mientras que la actividad GST estuvo altamente inducida en los animales depurados con 250 mg/L de NAC (Figura 4B).

El efecto del tratamiento con NAC ha mostrado ser dosis dependiente. A mayor concentración de NAC utilizada en la depuración, mayores son los niveles de GSH, la relación GSH/GSSG y las actividades GR y GST y menor la concentración del plaguicida en los mejillones. Por lo tanto, el incremento del contenido de GSH y la inducción de la actividad GST en la glándula digestiva son los responsables en gran medida de la considerable aceleración en la destoxificación y eliminación de fenitrotión de los tejidos de los mejillones tratados con NAC. Esto posibilita la utilización de la NAC para facilitar y acelerar la eliminación de contaminantes orgánicos de los tejidos de los moluscos bivalvos de cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Un precursor de la síntesis intracelular de glutatión **caracterizado** porque es útil en la destoxificación de contaminantes orgánicos durante el proceso de depuración de moluscos bivalvos.

2. Un precursor de la síntesis intracelular de glutatión según la reivindicación 1 **caracterizado** porque pertenece al siguiente grupo: *N*-acetilcisteína, 2-oxotiazolidina-4-carboxilato, ácido α -lipoico, ácido dihidrolipoico, ésteres de cisteína y glutatión, metionina, taurina, *N*-(2-mercaptopropionil)glicina, melatonina y sus derivados o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

3. Un precursor de la síntesis intracelular de glutatión según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el precursor de la síntesis intracelular de glutatión es la *N*-acetilcisteína o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

4. Uso de un compuesto precursor de la síntesis intracelular de glutatión según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3 para la fabricación de un medicamento útil en la destoxificación de contaminantes orgánicos durante el proceso de depuración de moluscos bivalvos.

5. Uso según la reivindicación 4 **caracterizado** porque los contaminantes orgánicos pertenecen a alguno de los siguientes grupos: plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, furanos y toxinas procedentes de episodios fitoplanctónicos.

6. Uso según la reivindicación 4 **caracterizado** porque los contaminantes orgánicos son plaguicidas organofosforados.

7. Uso según la reivindicación 4 **caracterizado** porque el plaguicida organofosforado es el fenitrotión.

8. Uso según la reivindicación 4 **caracterizado** porque el molusco bivalvo de cultivo pertenece al siguiente grupo: mejillón, ostra, ostrón, almeja, chirla, berberecho, coquina y pectínidos.

9. Uso según la reivindicación 4 **caracterizado** porque el precursor de la síntesis intracelular de glutatión es la *N*-acetilcisteína y el molusco bivalvo es el mejillón.

10. Uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión en procesos de depuración de moluscos bivalvos según las reivindicaciones de la 1 a la 9, **caracterizado** porque incrementa los niveles intracelulares de glutatión en los moluscos de cultivo.

11. Uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión en procesos de depuración de moluscos bivalvos según las reivindicaciones de la 1 a la 9, **caracterizado** porque induce la actividad glutatión *S*-transferasa en los moluscos de cultivo, lo que aumenta la capacidad de destoxificación de contaminantes orgánicos.

12. Uso de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión en procesos de depuración de moluscos bivalvos según las reivindicaciones de la 1 a la 9, **caracterizado** porque induce la actividad glutatión reductasa en los moluscos de cultivo, lo que aumenta la tolerancia al estrés oxidativo.

13. Composición farmacéutica para el tratamiento de la contaminación marina en moluscos bivalvos, **caracterizada** por la adición de un precursor de la síntesis intracelular de glutatión según las reivindicaciones de la 1 a la 4.

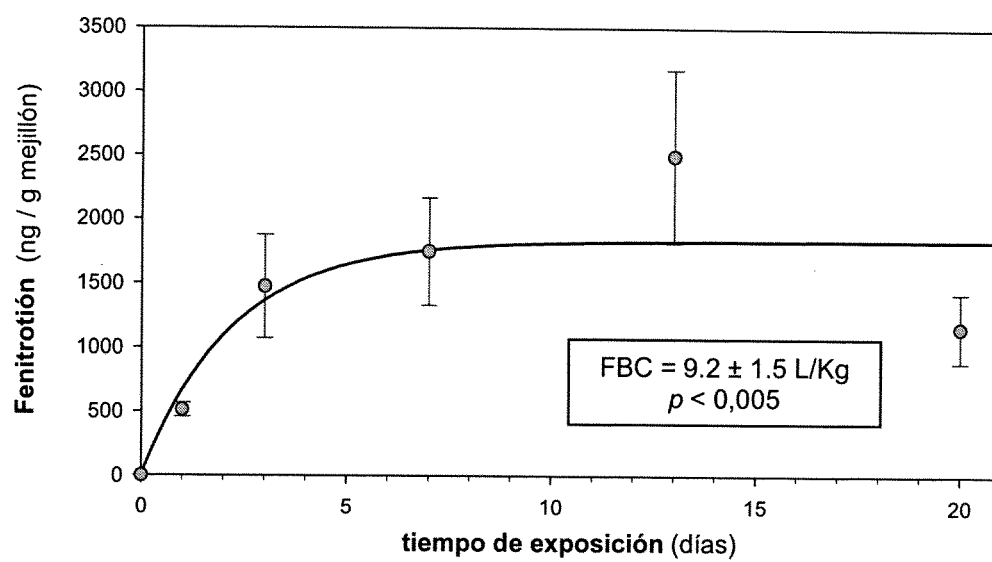


Figura 1

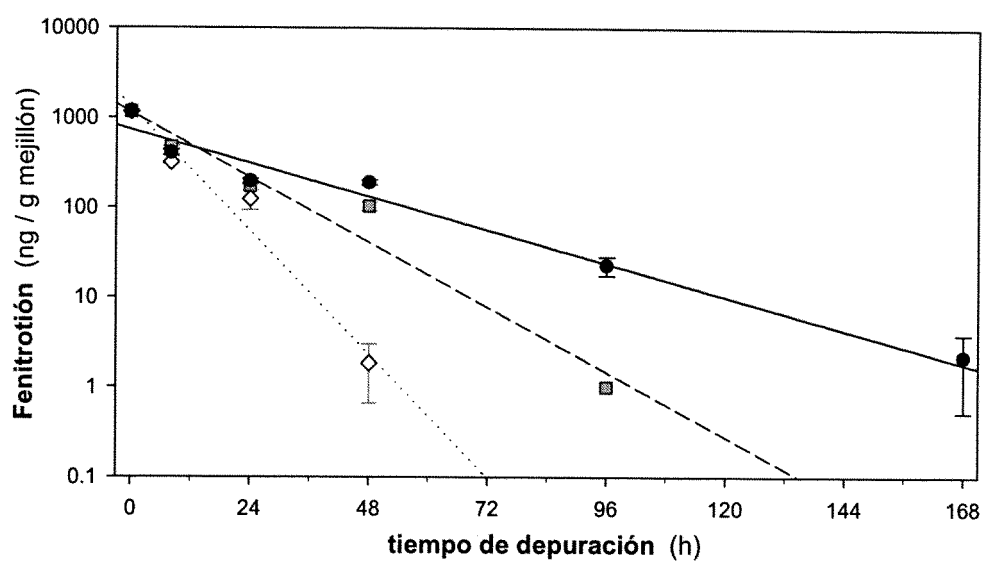


Figura 2

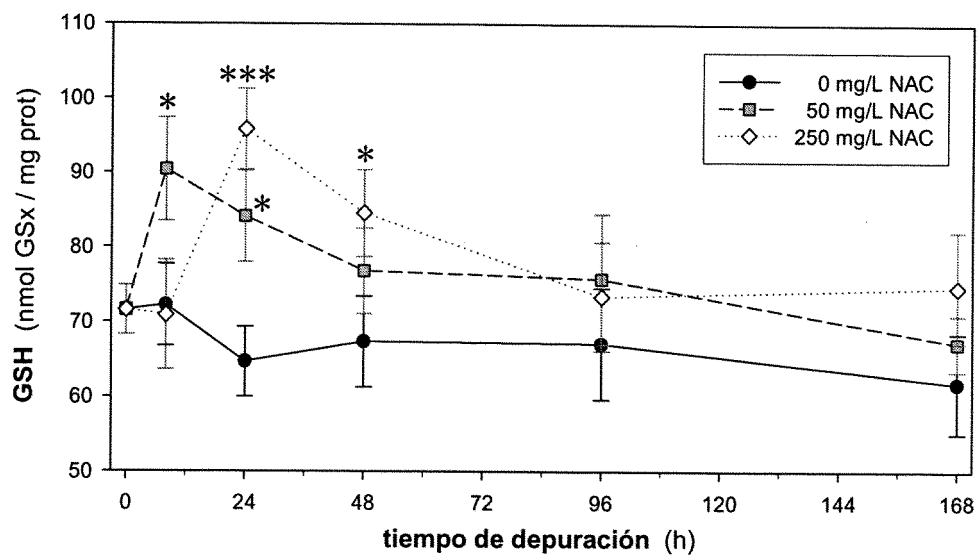


Figura 3A

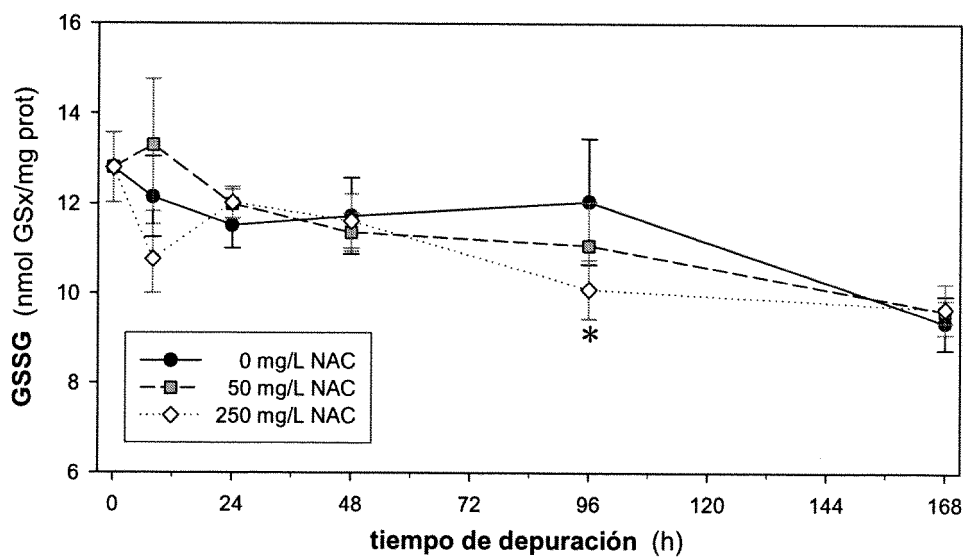


Figura 3B

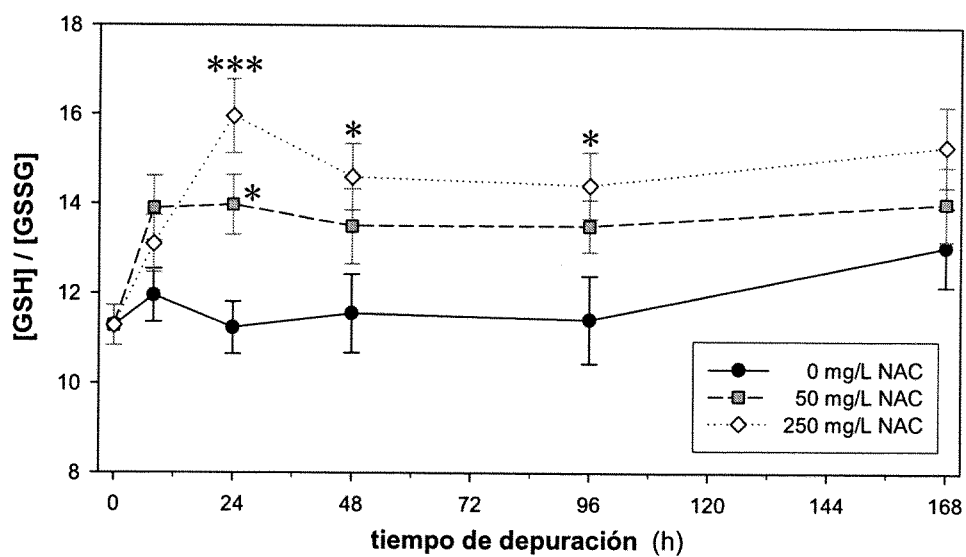


Figura 3C

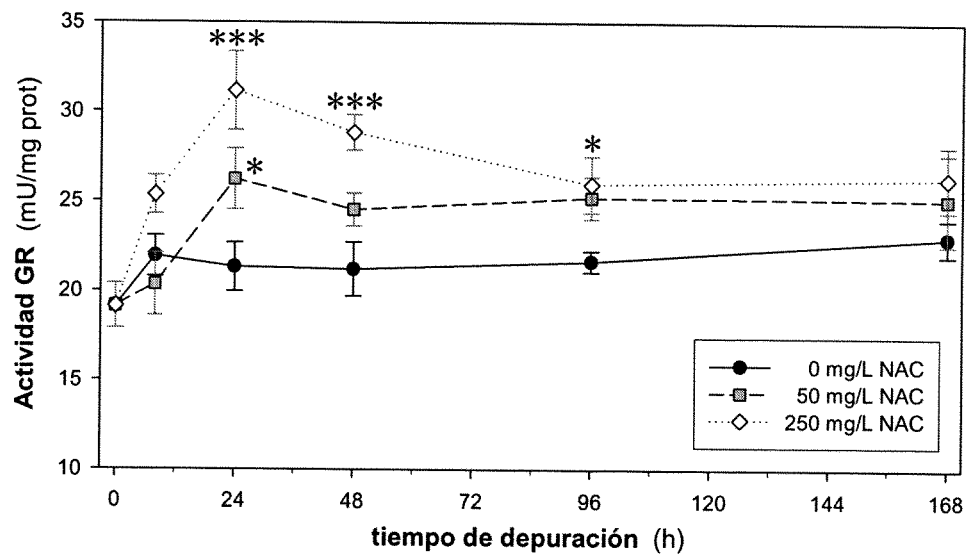


Figura 4A

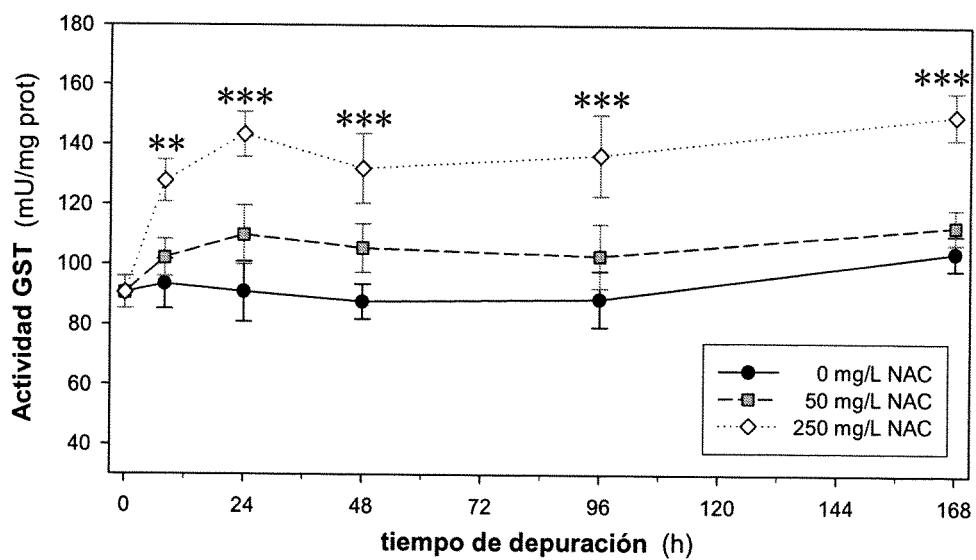


Figura 4B



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 306 567

⑫ Nº de solicitud: 200600493

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 01.03.2006

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	PEÑA-LLOPIS, S. Antioxidants as potentially safe antidotes for organophosphorus poisoning. Current Enzyme Inhibition, 2005, vol. 1 (2) páginas 147-156.	1-13
X	PEÑA-LLOPIS, S, et al. Increased recovery of brain acetylcholinesterase activity in dichlorvos-intoxicated European eels (Anguilla anguilla) by bath treatment with N-acetylcysteine. Diseases of Aquatic Organisms, 2003, vol. 55, páginas 237-245.	1-13
X	WO 03024487 A1 (N.V.NUTRICIA) 27.03.2003, página 9, línea 19 - página 10, línea 20.	1-3,13
Y		4-12
Y	PEÑA-LLOPIS, S. et al. Impaired glutathione redox status is associated with decreased survival in two organophosphate-poisoned marine bivalves. Chemosphere, 2002, vol. 47, páginas 485-497.	4-12
E,X	ES 2249167 A1 (C.S.I.C.) 16.03.2006, reivindicaciones 1,7; página 4, líneas 25-30.	

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

13.10.2008

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/198 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

A01K 61/00 (2006.01)

A23L 1/015 (2006.01)