



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 340 011**

② Número de solicitud: 200803359

⑤ Int. Cl.:
A61K 33/04 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.11.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.05.2010

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Sevilla**
OTRI-Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41013 Sevilla, ES

⑱ Inventor/es: **Cameán Fernández, Ana María;**
Atencio Genes, Loyda Esther;
Puerto Rodríguez, María;
Prieto Ortega, Ana Isabel;
Jos Gallego, Ángeles Mencía;
Moreno Navarro, Isabel;
Pichardo Sánchez, Silvia;
Moyano Salvago, María Rosario y
Blanco Rodríguez, Alfonso

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Uso de Selenio para proteger a los peces de la intoxicación por microcistinas.**

㉒ Resumen:

Uso de Selenio para proteger a los peces de la intoxicación por microcistinas.

En la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende Selenio para el tratamiento, prevención y/o recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a microcistinas (MCs). También se refiere al uso de la citada composición en la recuperación de las alteraciones histopatológicas producidas en los tejidos de la lista que comprende hígado, riñón, corazón, branquias y/o tracto gastrointestinal. Además, dicha composición se utiliza para la fabricación de un alimento funcional, un complemento vitamínico, o un complemento nutricional.

ES 2 340 011 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de Selenio para proteger a los peces de la intoxicación por microcistinas.

5 En la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende Selenio para el tratamiento, prevención y/o recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a microcistinas (MCs). También se refiere al uso de la citada composición en la recuperación de las alteraciones histopatológicas producidas en los tejidos de la lista que comprende hígado, riñón, corazón, branquias y/o tracto gastrointestinal. Además, dicha composición se utiliza para la fabricación de un alimento funcional, un complemento vitamínico, o un complemento nutricional.

10 **Estado de la técnica anterior**

15 El Selenio es un micronutriente esencial para animales y humanos. En animales se han descrito diferentes síndromes (alteraciones del crecimiento, degeneración muscular, cardiomiopatía, degeneración hepática, etc.) motivados por su deficiencia. En medicina veterinaria existe un amplio uso profiláctico y terapéutico de la sal selenito sódico, a menudo en combinación con la vitamina E, frente a diversas enfermedades relacionadas con las deficiencias de ambos nutrientes. Las dosis recomendadas de selenito sódico varían entre 0,01-0,08 mg Se⁴⁺/Kg peso (0,25-1,5 mg/Kg pienso) en las preparaciones destinadas a piensos medicados para caballo, vaca y oveja, así como en pollos y cerdos. (EMEA/MRL249/97 final, 1997). Selenito y seleniato sódicos han sido aprobados como aditivos alimentarios a una concentración máxima de 0,5 mg Se por Kg de pienso.

20 El mecanismo principal de acción de los efectos fisiológicos y farmacológicos del Selenio se basa en su efecto antioxidante de las membranas celulares frente a peróxido de hidrógeno, lipoperóxidos y a especies reactivas de oxígeno (ROS) en general. Los efectos están relacionados con la actividad enzimática de la enzima Glutación Peroxidasa (GPx), que contiene selenocisteína, en concreto cuatro subunidades y cada una de ellas contiene un átomo de Selenio (Batcioglu K *et al.* (2002) *Cell Biochem Funct* 20:115-118). También es un componente integral de otras proteínas funcionales, como por ejemplo tetra-iodotironina-5'-I-deiodinasa, que interviene en el metabolismo de hormonas tiroideas y tioredoxina reductasa, involucrada en la síntesis de ADN, defensa frente estrés oxidativo y reparación de proteínas. Su acción protectora antioxidante se ha descrito en el documento WO2006018294-A1, junto con la vitamina E.

25 En peces se ha empleado el selenito sódico como aditivo alimentario en piensos, para mejorar la eficiencia de piensos vegetales (JP61146155-A). El Selenio mejora las defensas antioxidantes fisiológicas en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Miller LL *et al.* (2007) *Aquat Toxicol* 83:263-271). Asimismo el Selenio se ha utilizado en combinación con cobre para mejorar la respuesta de los animales al estrés oxidativo (Lin Yu-Hung y Shiau Shi-Yen (2007) *International Symposium on Fish Nutrition and Feeding* 267: 38-43).

30 Por otro lado, las MCs son toxinas producidas por cianobacterias tóxicas presentes en aguas superficiales, que pueden bioacumularse en pescados de consumo público a niveles muy próximos e incluso superiores a la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) provisional establecida, afectando a la calidad y seguridad de este tipo de alimentos y suponiendo un riesgo potencial para el consumidor. Las MCs han ocasionado episodios de muerte masiva en peces, siendo responsables de la enfermedad denominada "NetPen Liver Disease" (NPLD) en salmones procedentes del Atlántico criados en cautividad. En comparación con los mamíferos, los peces son menos sensibles a los efectos tóxicos, lo que podría permitir una mayor acumulación, existiendo variabilidad en función de la especie y destacando su mayor distribución 35 pues afectan no sólo al hígado sino también al riñón, corazón, branquias, piel, médula y sangre, alterando además el comportamiento y el desarrollo. Las cianobacterias constituyen parte de la dieta de diversos ciprinidos y cíclidos, como es el caso de las especies de peces a las que se aplica esta invención, principalmente Tilapias (*Oreochromis sp.*). La Tilapia (*Oreochromis sp.*) es uno de los pescados que más rápidamente se ha introducido en acuicultura, por la facilidad que presenta su manejo, gran capacidad de adaptación a condiciones adversas y fácil reproducción; sus distintas variedades son filtradoras y consumidoras de cianobacterias y en Europa se está despertando un gran interés por su cultivo.

40 Como mecanismo de acción tóxica más aceptado, las MCs a nivel subcelular son inhibidores específicos de las fosfatasa de proteínas tipo 1 (PP1) y 2A (PP2A), desencadenando un proceso de apoptosis y consecuente daño celular. Por otro lado, el estrés oxidativo juega un papel muy significativo en la patogenicidad de estas toxinas, detectándose un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como cambios en la actividad de diversas enzimas antioxidantes en roedores y peces.

45 Actualmente no existe un tratamiento antidótico específico en casos de intoxicación por MCs procedentes de cianobacterias. Varios estudios han demostrado los efectos protectores de ciertos antioxidantes frente a su acción tóxica en roedores, cuando se administran previamente a la exposición de las toxinas, como es la suplementación con la vitamina E, la vitamina C, licopenos, ciertos polifenoles del té, flavonoides o melatonina.

50 Hasta la fecha no se conoce ningún tratamiento capaz de recuperar a los peces intoxicados con MCs. Teniendo en cuenta la ubicuidad de estas toxinas se hace necesario recuperar peces que presenten alteraciones histopatológicas con diferentes niveles de afección que pueden impedir el ciclo de vida normal de los peces afectados.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende Selenio para el tratamiento, prevención y/o recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a MCs.

En tilapias (*Oreochromis sp.*) expuestas a dosis únicas y repetidas de MCs se inducen estrés oxidativo y alteraciones patológicas. En concreto, se han comprobado variaciones dosis-dependiente en la actividad de diversas enzimas antioxidantes, disminución de los niveles de Glutación (GSH), aumento de los niveles de lipoperoxidación (LPO) y de oxidación de proteínas, en diferentes órganos (hígado, riñón, branquias, etc.), y múltiples alteraciones histopatológicas en órganos diversos como hígado, riñón, branquias o corazón.

El selenio administrado en la presente invención se muestra efectivo manteniendo el estado de salud del pez, previniendo daños causados por las toxinas y/o mejorando los efectos tóxicos inducidos por MCs en diversos órganos de tilapias intoxicadas.

El uso de Selenio como aditivo alimentario no solo mejora los niveles de GSH hepáticos, sino que por su propia actividad antioxidante es capaz de disminuir la lipoperoxidación (LPO) (hígado, riñón), aumentar el contenido proteico en hígado y recuperar las lesiones histopatológicas inducidas en múltiples órganos como hígado, riñón, corazón, tracto gastrointestinal y/o branquias.

En este sentido, un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende Selenio para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento, prevención y/o recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a MC.

La composición de la presente invención comprende, al menos, Selenio y el medicamento está compuesto, al menos, por la composición anterior. De esta forma, el Selenio, sus sales, derivados farmacéuticamente aceptables o sus profármacos, se formulan en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El medicamento se emplea para el tratamiento de los efectos tóxicos en peces expuestos a MC.

Por un “derivado farmacéuticamente aceptable” se entiende cualquier sal, farmacéuticamente aceptable o cualquier otro compuesto que después de su administración, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) Selenio. Preferiblemente la sal de Selenio es selenito sódico ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye sólidos o líquidos, disolventes, tensioactivos, etc.

El término “tratamiento” tal como se entiende en la presente invención supone combatir los efectos tóxicos para estabilizar el estado de toxicidad de los individuos. El medicamento se emplea también para la prevención de los efectos tóxicos ocasionados a los peces expuestos a MCs. El término “prevención” tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de efectos tóxicos en peces expuestos a MCs. En este caso, previamente a la intoxicación por MCs, los peces están protegidos por un aumento de las defensas antioxidantes producidos por la acción del Selenio. El medicamento también se emplea para la recuperación de los efectos tóxicos ocasionados en peces expuestos a MC.

El término “efectos tóxicos” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a la consecuencia derivada de la exposición del pez a la toxina MC, es decir, la aparición de diversos efectos adversos como por ejemplo un daño celular que ocasiona un daño en los tejidos biológicos lo que a su vez puede provocar un cambio en las funciones fisiológicas y en el metabolismo celular.

Las MCs son toxinas de estructura heptapeptídica producidas tanto por cianobacterias filamentosas (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*) como coloniales (*Microcystis*). Una vez que se ingieren, las MCs se transportan hasta el hígado donde la mayoría quedan almacenadas y el resto permanecen en la sangre y pueden contaminar otros tejidos. Las MCs se unen covalentemente a fosfatasa de proteínas bloqueando así numerosos procesos de control celular. La MC de la presente invención se selecciona de la lista que comprende microcistina LA, microcistina LR, microcistina YR, microcistina RR, microcistina YM, microcistina YA, microcistina LY, microcistina FR, microcistina Laba, microcistina HtyR, microcistina AR, microcistina M(O)R, microcistina WR, 3-desmetilmicrocistina LR, 7-desmetilmicrocistina LR, 3,7-didesmetilmicrocistina LR, 3-desmetilmicrocistina YR, 7-desmetilmicrocistina YR, 3-desmetilmicrocistina RR, 7-desmetilmicrocistina RR, 3,7-didesmetilmicrocistina RR, 3-desmetilmicrocistina HtyR, 7-desmetilmicrocistina HtyR, 3,7-didesmetilmicrocistina HtyR, 7-desmetilmicrocistina HphR, (Mser7)microcistina LR, (Ser7)microcistina LR, (Ser7)microcistina RR, (Ser7)microcistina HtyR, (Ser7)3-desmetilmicrocistina XR, (DMAdda) microcistina LR, (ADMAdda) microcistina LR, (ADMAdda)3-desmetilmicrocistina LR, (ADMAdda) microcistina Lhar, (ADMAdda,Mser7) microcistina LR, D-Glu(CH₃O)estermicrocistina LR, D-Glu(CH₃O)ester 3-desmetilmicrocistina LR, D-Glu(C₃H₇O₂)ester microcistina LR o (D-Ser1, ADMAdda) microcistina LR. La lista anterior no se limita a las MCs mencionadas. Preferiblemente la MC es microcistina LR (MC-LR).

ES 2 340 011 A1

Un segundo aspecto de la presente invención es el uso de una composición que comprende Selenio para la elaboración de un medicamento útil en la recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a MCs. El término “recuperación” hace referencia a la desaparición de los efectos tóxicos causados por la intoxicación con MCs. Esta recuperación supone la reversión total de los daños causados en los tejidos del pez, recuperando de esta forma las funciones normales de los órganos afectados.

Una realización aún más preferida de la presente invención comprende el uso de una composición que contiene Selenio para la elaboración de un medicamento útil en la recuperación de las alteraciones histopatológicas producidas en los tejidos de la lista que comprende hígado, riñón, corazón, branquias y/o tracto gastrointestinal. Tal como se ha mencionado anteriormente las MCs pueden acumularse en el tejido hepático y también pueden llegar a otros órganos utilizando la sangre como medio de dispersión, de esta forma, las MCs pueden causar efectos tóxicos y/o alteraciones histopatológicas en los citados órganos. La recuperación de los tejidos afectados por las alteraciones histopatológicas es un aspecto destacable de la presente invención ya que puede suponer la curación de los peces cultivados, peces seleccionados por diversas características para la cría, peces de especies en peligro de extinción o cualquier otro tipo de pez que presente alteraciones histopatológicas en un grado reversible.

La recuperación que se produce en las alteraciones histopatológicas en algunos órganos consiste en:

- Hígado: las MCs producen una desorganización del parénquima hepático, observándose hepatocitos con citoplasmas muy claros y el contorno celular a modo de célula en cebolla, y estructuralmente se observa que poseen citoplasma con escasos organoides y citoplasma repleto de glucógeno granular. Mediante la administración de Selenio se consigue que los cordones hepáticos sean normales, hepatocitos con morfología poliédrica normal, con organoides citoplasmáticos normales y ausencia de glucógeno granular.

- Riñón: se recupera la glomerulopatía y atrofia glomerular evidentes, producida por la intoxicación con MCs. Con la administración de selenio se observan glomérulos con los capilares fenestrados aparentemente normales.

- Corazón: Las MCs inducen miofibrosis parcial, edema y microhemorragias, que son superados por la dosis más elevada de selenio (ver más adelante).

- Intestino: El tratamiento con selenio recupera la pérdida, prácticamente total, de microvellosidades producidas por las MCs, apareciendo los enterocitos aparentemente normales y abundantes células calciformes.

- Branquias: Las MCs inducen una hiperemia generalizada, que es revertida por Selenio.

En una realización más preferida de la presente invención, el Selenio se administra en una cantidad diaria de entre 1,5 y 6 μg de Selenio por g de dieta (equivale a una cantidad diaria de entre 5 y 20 μg de selenito sódico por g de dieta). Esta administración se lleva a cabo durante al menos una semana. Preferiblemente la cantidad diaria incorporada a los peces es de entre 3 y 6 μg de Selenio por g de dieta. Tal como los inventores han determinado, la administración de cantidades diarias superiores a 6 μg de Selenio por g de dieta, pueden ocasionar alteraciones de los valores basales de ciertos biomarcadores de estrés oxidativo (Catalasa en riñón y la relación GSH/GSSG en hígado) e inducir LPO y oxidación de proteínas en peces no intoxicados.

Esta composición, se puede administrar de distintas formas, entre ellas, pero sin limitarse, intraperitonealmente, oralmente, bucalmente, intramuscularmente o de forma subcutánea. Más preferiblemente se administra de forma oral o intraperitoneal. En otra realización más preferida la composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral o intraperitoneal.

Los peces intoxicados están expuestos a más de 60 μg de MC por pez y por día durante 21 días (intoxicación subcrónica). Preferiblemente los peces están expuestos a más de 120 μg de MC por pez en exposición única.

Otra realización preferida de la invención, comprende el uso de la composición descrita, que además incluye excipientes farmacológicamente aceptables.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la sustancia activa (en la presente invención, Selenio), estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos como por ejemplo almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento como por ejemplo para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente “farmacológicamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

En una realización más preferida de la invención, la composición comprende además otra sustancia activa.

En cada caso la composición se adaptará al tipo de administración utilizada, por ello, la composición de la presente invención se puede presentar bajo la forma de soluciones o cualquier otra forma de administración clínicamente permitida y en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 5 Otras realizaciones preferidas son el uso para la fabricación de un alimento funcional, el uso para la fabricación de un complemento vitamínico y otra más es el uso para la fabricación de un complemento nutricional.

El Selenio puede formar parte de un alimento funcional, complemento vitamínico, complemento nutricional o cualquiera de sus combinaciones. Tal como se entiende en la presente invención, un alimento funcional cumple una
10 función específica como puede ser la de mejorar la salud de los peces. Para ello al alimento funcional se le puede agregar un complemento vitamínico y/o complemento nutricional. El alimento funcional, los complementos descritos o cualquiera de sus combinaciones pueden administrarse junto con un pienso, formar parte de la composición del pienso o pueden administrarse de forma independiente.

- 15 En una realización preferida, de la presente invención, los peces son cultivados.

En la presente invención se entiende por “peces cultivados” aquellos peces criados en piscifactorías, charcas o cualquier contenedor de agua de cualquier tamaño que permita la cría de peces y/o el engorde. Los peces cultivados pueden ser, sin limitar, peces destinados a la alimentación o a la cría de peces ornamentales.

- 20 En otra realización preferida, de la presente invención, los peces pertenecen al género *Oreochromis sp.*

Los peces pertenecientes a este género se conocen como Tilapias. Las Tilapias crecen en aguas cálidas dulces o saladas y tienen pocas exigencias respiratorias, rápido crecimiento y facilidad para la puesta. Los peces se seleccionan,
25 sin limitar, de la lista que comprende *O. amphimelas*, *O. andersonii*, *O. angolensis*, *O. aureus*, *O. chungruruensis*, *O. esculentus*, *O. hunteri*, *O. ismailiaensis*, *O. jipe*, *O. karomo*, *O. karongae*, *O. korogwe*, *O. lepidurus*, *O. leucostictus*, *O. lidole*, *O. macrochir*, *O. malagarasi*, *O. mortimeri*, *O. mossambicus*, *O. mweruensis*, *O. niloticus* (Nile tilapia), *O. Pantani*, *O. pangani girigan*, *O. pangani pantani*, *O. placidus*, *O. placidus placidus*, *O. placidus ruvumae*, *O. rukwaensis*, *O. saka*, *O. salinicola*, *O. schwebischi*, *O. shiranus*, *O. shiranus chilwae*, *O. shiranus shiranus*, *O. spilurus*,
30 *O. spilurus niger*, *O. spilurus percivali*, *O. spilurus spilurus*, *O. squamipinnis*, *O. tanganicae*, *O. upembae*, *O. urolepis*, *O. urolepis hornorum*, *O. urolepis urolepis* u *O. variabilis*. Más preferiblemente los peces pertenecen a la especie *O. niloticus* (Nile tilapia).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir
35 otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

40 Descripción de las figuras

Fig 1. Muestra el efecto protector de diferentes dosis de Selenio (selenito sódico) sobre las lesiones hepáticas inducidas por MC en tilapias expuestas a 120 μg MC/pez (dosis única).

- 45 (A, C, E, G) Tinción Hematoxilina-eosina. Barras 100 μm . (B, D, F, H) Observaciones ultraestructurales (microscopía electrónica). Barras 10, 5, 10, 10 μm .

(A, B) Peces control; (C, D) tilapias expuestas sólo a MCs (120 μg MC/pez). C: Parénquima hepático desorganizado, hepatocitos con citoplasmas muy claros y el contorno celular a modo de célula en cebolla (flecha). D: El hepatocito presenta un núcleo denso normal (N) rodeado de un citoplasma con escasos organoides y el resto del citoplasma repleto de glucógeno granular (círculo); (E, F) Peces expuestos a MC+Selenio dosis baja (1,5 μg Se/g dieta). E. Parénquima con escasos hepatocitos con degeneración glucogénica sin mostrar la morfología de célula en cebolla (flecha). F. Hepatocitos con mayor desarrollo de los organoides citoplasmáticos (círculo). (G, H) Peces expuestos a MC+Selenio dosis media (3,0 μg Se/g dieta). G. Cordones hepáticos normales y H. Detalle de hepatocito normal con organoides citoplasmáticos, retículos (R), mitocondrias (estrella), lisosomas (flecha) y ausencia de glucógeno granular.

Fig. 2. Muestra el efecto protector de diferentes dosis de Selenio (selenito sódico) sobre las lesiones renales inducidas por MCs en tilapias expuestas a 120 μg MC/pez (dosis única).

- 60 (A, C, E, G) Tinción Hematoxilina-eosina. Barras 100 μm . (B, D, F, H) Observaciones ultraestructurales (microscopía electrónica). Barras 10, 10, 10, 5 μm .

(A, B) peces control; (C, D) tilapias expuestas sólo a MCs (120 μg MC/pez.). C. Glomerulopatía y atrofia glomerular evidente (círculo), representado por una pérdida en el tamaño, hialinizaciones intraglomerulares y pérdida de capilares. D. Glomérulos con engrosamiento y densificaciones de las membranas basales (flechas) y colapsamientos de las luces de los capilares fenestrados (círculo). (E, F) Peces expuestos a MC+Selenio dosis baja (1,5 μg Se/g

dieta). E. Glomerulopatía con cierta desorganización interna (rombo), aumento de las células mesangiales (asterisco) y tenue dilatación de la cápsula de Bowman (flecha). F. Capilares fenestrados con la pared del endotelio (1), membrana basal (2) y podocitos (3) prácticamente normal y restos de endotelio tumefacto (círculo). (G, H) Peces expuestos a MC+Selenio dosis media (3,0 μg Se/g dieta). G. Glomérulos prácticamente normales (círculos), algunos con cierta tumefacción de los capilares fenestrados (flecha). H. cierto grado de tumefacción del endotelio capilar (círculo).

Fig. 3. Muestra el efecto protector de diferentes dosis de Selenio (selenito sódico) sobre las lesiones en corazón inducidas por MCs en tilapias expuestas a 120 μg MC/pez (dosis única).

(A, C, E, G) Tinción Hematoxilina-eosina. Barras 100 μm . (B, D, F, H) Observaciones ultraestructurales (microscopía electrónica). Barras 5, 10, 10, 10 μm .

(A, B) peces control; (C, D) tilapias expuestas sólo a MCs (120 μg MC/pez). C. Miofibrosis (flecha). Edema escaso (estrella) y microhemorragias (círculo). D. Pérdida casi total de las miofibrillas, restos de miofibrillas (flecha) y de mitocondrias (estrella). Abundante sarcoplasma sin estructura (círculo). (E, F) Peces expuestos a MC+Selenio dosis baja (1,5 μg Se/g dieta). E. Miofibrosis parcial (círculo), escaso edema (estrella) y microhemorragias (flecha). F. Recuperación de miofibrillas con núcleo desplazado (N). (G, H) Peces expuestos a MC+Selenio dosis media (3,0 μg Se/g dieta). G. Tenue miofibrosis (flecha). Zonas poco edematosas y escasas microhemorragias. H. Abundantes miofibrillas (flecha) y abundantes mitocondrias (círculo).

Fig. 4. Muestra el efecto protector de diferentes dosis de Selenio (selenito sódico) sobre las lesiones en tracto gastrointestinal inducidas por MCs en tilapias expuestas a 120 μg MC/pez (dosis única).

(A, C, E, G) Tinción Hematoxilina-eosina. Barras 50, 50, 100, 100 μm . (B, D, F, H) Observaciones ultraestructurales (microscopía electrónica). Barras 20, 10, 20, 20 μm .

(A, B) peces control; (C, D) tilapias expuestas sólo a MCs (120 μg MC/pez). C. Acortamiento de las vellosidades intestinales con necrosis en la zona apical (círculo). D. Detalle del epitelio intestinal con núcleos muy densos (N) y pérdida prácticamente total de las microvellosidades (círculo). (E, F) Peces expuestos a MC+Selenio dosis baja (1,5 μg Se/g dieta). E. Vellosidades cortas de escasos tamaños, vacuolizaciones citoplasmáticas en enterocitos (círculo). F. Detalle del epitelio con recuperación parcial de las microvellosidades (círculo). (G, H) Peces expuestos a MC+Selenio dosis media (3,0 μg Se/g dieta). G. Vellosidades cortas, células intestinales (enterocitos) con vacuolización y células caliciformes (flecha). H. Recuperación parcial de las microvellosidades (círculo).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen el uso de Selenio (selenito sódico) para tratamiento, prevención y/o recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a MCs.

Ejemplo 1

La invención se llevó a cabo empleando un total de 64 peces macho de *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia), de peso medio 50 ± 7 g, y longitud de 12 ± 2 cm, obtenidos en una piscifactoría, y transferidos en acuarios (96 L) con sistema de filtración de agua y aireación adecuados, y ciclos de 12/12 h luz/oscuridad. Los peces fueron alimentados con comida comercial (Dibaq, Segovia, España), en una cantidad de 0,3 g/día. Los peces se aclimataron durante 15 días antes del experimento. Se llevó a cabo la extracción de las MCs a partir de un liofilizado de células de cianobacterias procedentes de una floración natural que contenía 2885 $\mu\text{g/g}$ de MC-LR, según el método de Moreno *et al* (2004, *Biol Res* 37:405-417). Se utilizaron 8 grupos experimentales con 8 animales en cada uno. Cada grupo fue introducido en un acuario independiente:

Acuario 1: peces control, alimentados sólo con pienso normal durante 7 días.

Acuario 2: peces alimentados con pienso durante 7 días, intoxicados con MCs en la dieta (dosis única de 120 $\mu\text{g/pez}$).

Acuarios 3, 5 y 7: Peces alimentados con pienso + Selenito sódico (equivalentes a 1.5, 3.0 ó 6.0 μg Selenio/g dieta, respectivamente) durante 7 días.

Acuarios 4, 6 y 8: Peces con pienso + Se (1.5, 3.0 ó 6.0 μg Selenio/g dieta, respectivamente) durante 7 días. Los peces son infectados con una dosis única de 120 μg MC/pez.

Al final del experimento los peces fueron sacrificados, anestesiándolos con hielo, se procedió a la extracción de los órganos, que se fijaron en formol tamponado 10% 24 h a 4°C, y procesados para su estudio al microscopio óptico

ES 2 340 011 A1

(etanol, xilol, parafina, y tinción hematoxilina y eosina) y al microscopio electrónico, de acuerdo con Atencio *et al* (2008, *Toxicol Pathol* 36:449-458). Los resultados más significativos fueron los siguientes:

5 1) En la Fig 1 se observa la degeneración glucogénica del hígado producida por las MCs, mostrando los hepatocitos un contorno de células en cebolla. La dosis más baja de Selenio (1,5 μg Selenio/g dieta) no recuperó dicha degeneración, aunque fue menos severa, mientras que las dosis intermedias y elevadas recuperan la arquitectura del parénquima hepático, con hepatocitos poliédricos.

10 2) En la Fig 2 se observan los cambios degenerativos inducidos por MCs en riñón: atrofia glomerular, glomerulopatía, engrosamiento de las membranas basales y capilares fenestrados colapsados. Una recuperación total de dichas lesiones se consigue con la suplementación de 6.0 μg Selenio/g dieta.

15 3) Las lesiones cardíacas caracterizadas por una marcada miofibrosis, edema generalizado y microhemorragias fueron totalmente superadas con la dosis de 6.0 μg Selenio/g dieta.

20 4) En tracto gastrointestinal, el proceso de enteritis necrótico producido por MCs fue recuperado, así como las lesiones en branquias.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende Selenio para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de efectos tóxicos en peces expuestos a microcistinas.
2. Uso de una composición que comprende Selenio para la elaboración de un medicamento útil en la recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a microcistinas.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde los efectos tóxicos son alteraciones histopatológicas.
4. Uso según la reivindicación 3, donde las alteraciones histopatológicas son producidas en al menos uno de los tejidos de la lista que comprende hígado, riñón, corazón, branquias o tracto gastrointestinal.
- 15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el Selenio se administra en una cantidad diaria de entre 1,5 y 6 μg de Selenio por g de dieta.
6. Uso según la reivindicación 5, donde la composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral o intraperitoneal.
- 20 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición incluye excipientes farmacológicamente aceptables.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición comprende además otra sustancia activa.
- 25 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de un alimento funcional.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un complemento vitamínico.
- 30 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la fabricación de un complemento nutricional.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde los peces son cultivados.
- 35 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde los peces pertenecen al género *Oreochromis sp.*

40

45

50

55

60

65

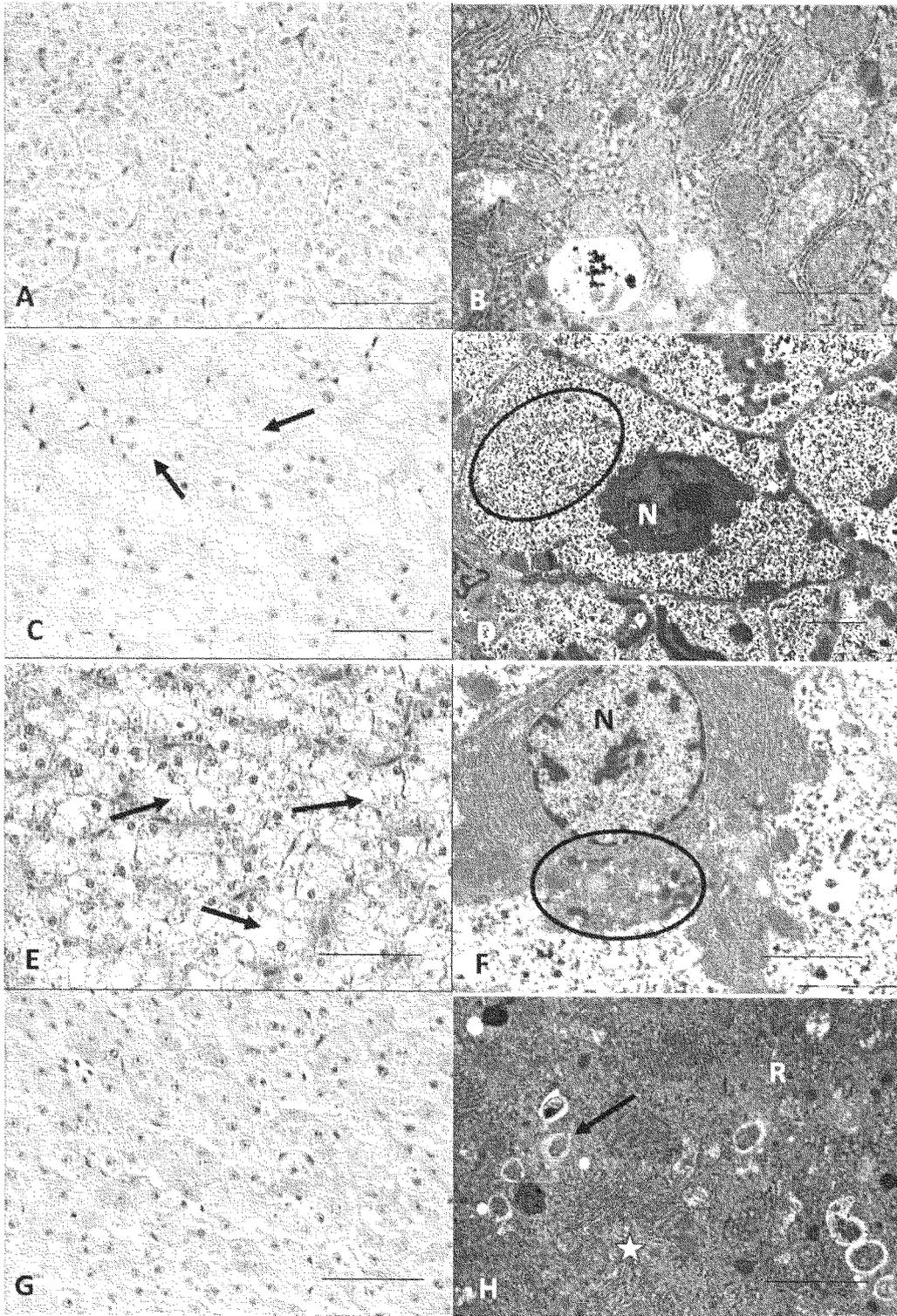


FIG. 1

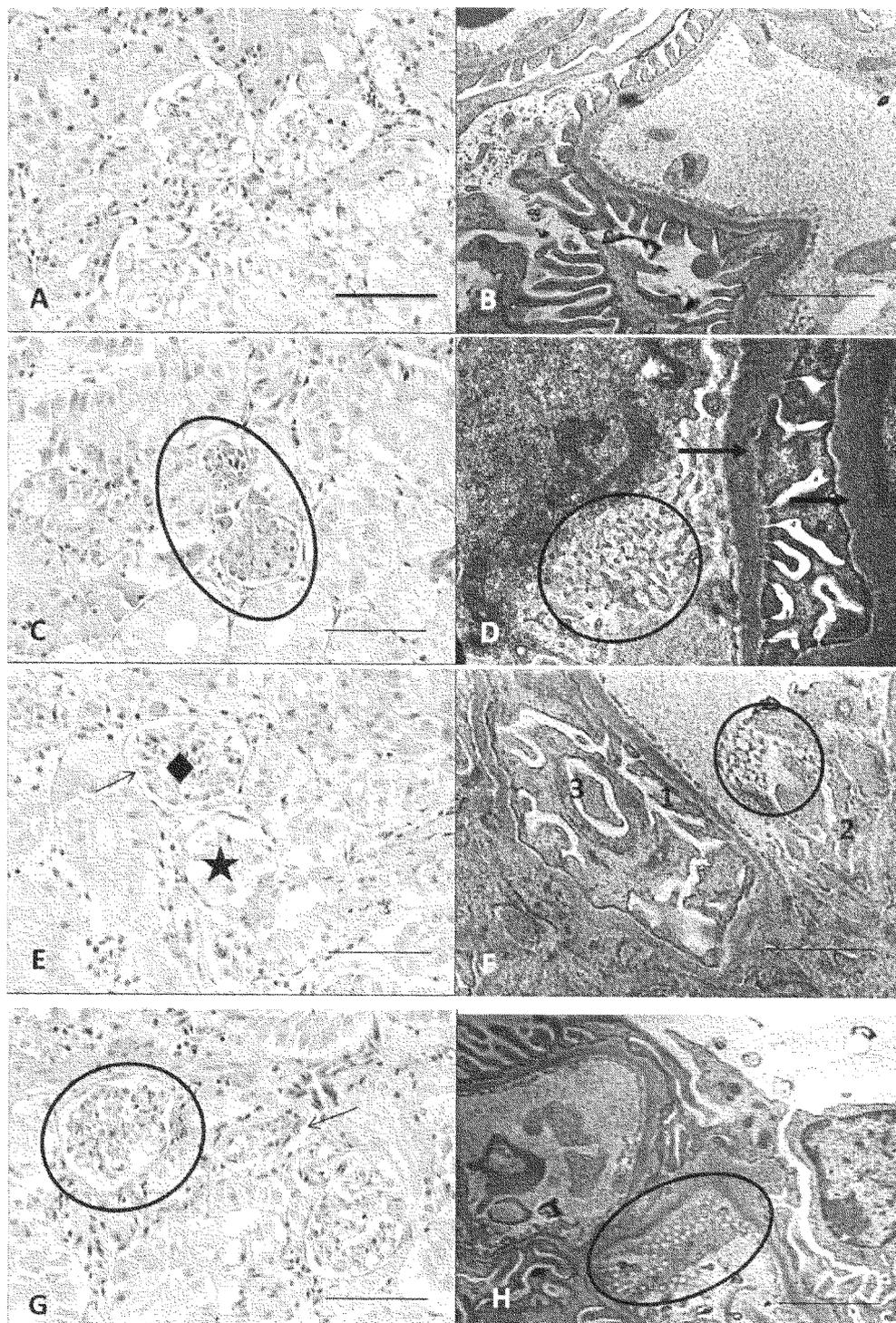


FIG. 2

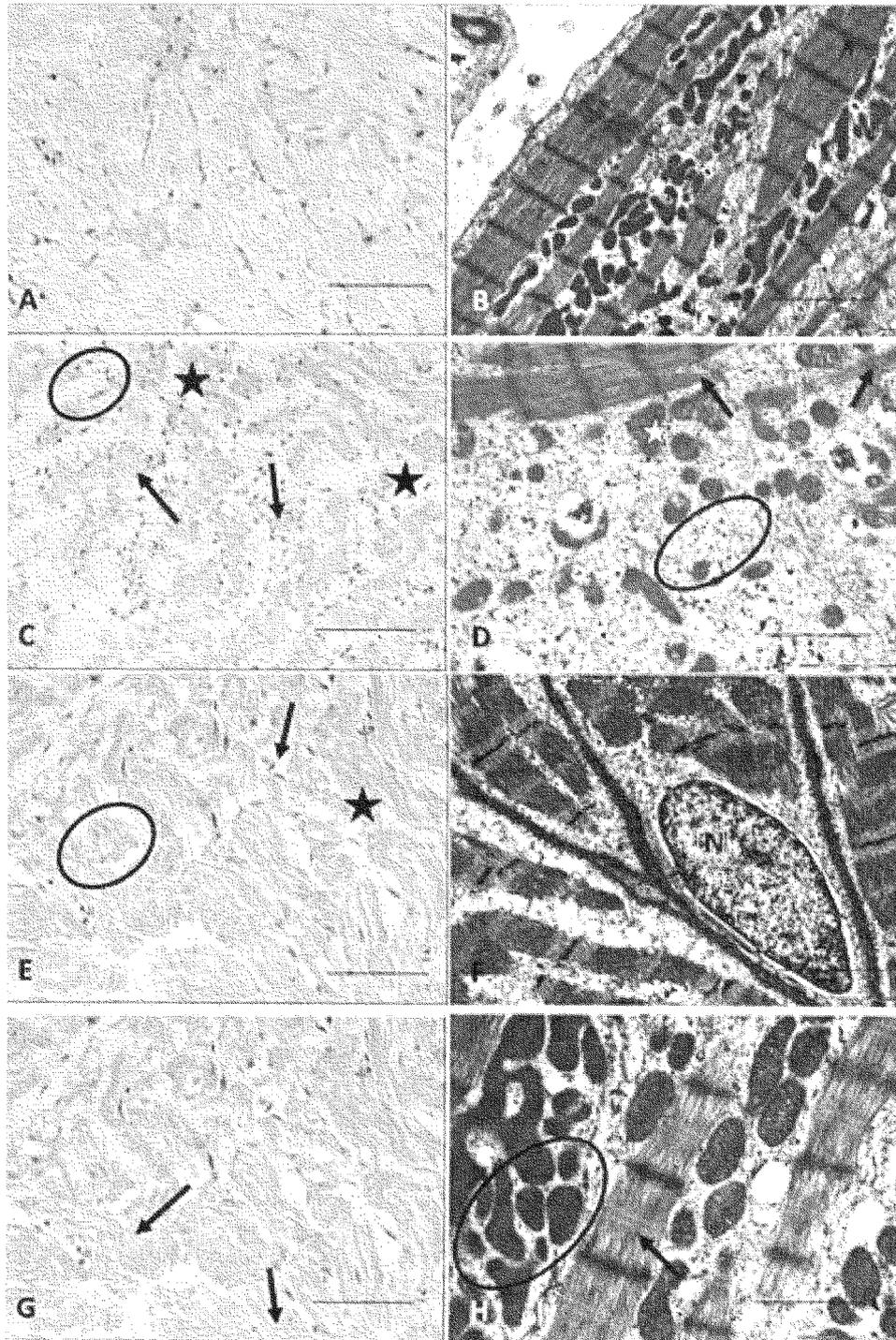


FIG. 3

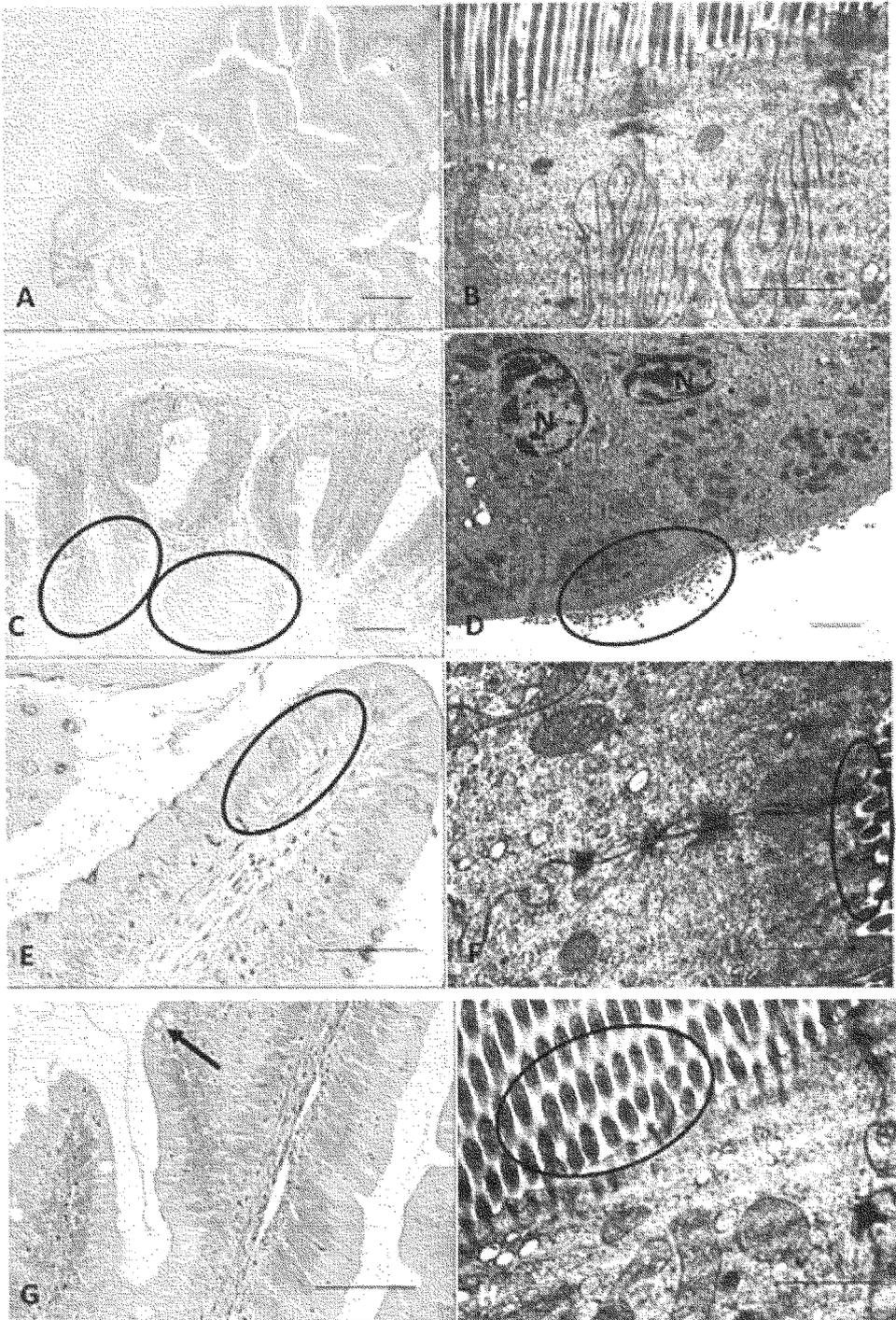


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 011

② Nº de solicitud: 200803359

③ Fecha de presentación de la solicitud: **26.11.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
E	CN 101438768 A (UNIV. JINAN) 27.05.2009, resumen [en línea] Recuperado de: EPO WPI [recuperado el 22.03.2010]	1,2,6,9, 11,12
X	ATENCIO, L. et al. Protective effect of selenium from oxidative stress in different fish species (Tench and Tilapias) under laboratory conditions. Toxicology letters, octubre 2008 (en-línea), vol, 180 (1), página S193.	1-13
X	GEHRINGER, M. et al. An investigation into the effect of selenium supplementation on microcystis hepatotoxicity. Toxicon, 2003, vol. 41, páginas 1-8.	1-13
X	AMARAL MONTEIRO, D et al. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxa, Brycon cepahlus (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology, part c, julio 2008 (en-línea) vol. 149, páginas 40-49.	1-13
X	ORUN, I. et al. Antioxidative role of selenium on some tissues of (Cd 2+, Cr 3+) induced rainbow trout. Ecotoxicology and Environmental Safety, octubre 2007 (en-línea), vol. 71, páginas 71-75.	1-13
X	LIN Y. et al The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, Epinephelus malabaricus, fed high copper. Aquaculture, 2007, vol. 267, páginas 38-43.	1-13
A	JP 7099858 A (NIPPON SUISA KAISHA) 18.04.1995, resumen. [en línea] Recuperado de: EPO PAJ. [recuperado el 22.03.2010].	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 26.03.2010	Examinador A. Polo Díez	Página 1/6
---	-----------------------------------	----------------------



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 011

② Nº de solicitud: 200803359

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JP 6113753 A (ASAHI CHEMICAL IND.) 26.04.1994, resumen. [en línea] Recuperado de: EPO PAJ. [recuperado el 22.03.2010].	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

26.03.2010

Examinador

A. Polo Díez

Página

2/6

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 33/04 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A23K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3,4,7,8,10	SÍ
	Reivindicaciones	1,2,5,6,9,11,12 y 13	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-13	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CN 101438768	2009
D02	ATENCIO et al.	2008
D03	GEHRINGER et al.	2003
D04	AMARAL MONTEIRO et al.	2008
D05	ORUN et al.	2007
D06	LIN Y SHIAU	2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente se refiere al uso del selenio para la elaboración de medicamentos útiles para el tratamiento, prevención y recuperación de efectos tóxicos que producen las microcistinas en los peces (reivindicaciones independientes 1 y 2). En las reivindicaciones dependientes se dan algunos detalles del uso del selenio en dichos medicamentos.

Novedad y actividad inventiva (art. 6 y 8 de la ley de patentes)

El resumen de la patente D1 divulga el uso del selenio y el glutatión como aditivos en la alimentación para peces. Este aditivo mejora la resistencia de los peces a los tóxicos, en concreto a las microcistinas, ya que promueve la expresión de los genes relacionados con la detoxificación. Este documento, que aporta la misma solución que la solicitud y ha sido presentado con anterioridad a la solicitud, no se considera estado de la técnica por haber sido publicado con posterioridad a la fecha de presentación de solicitud y, por ello, no afecta a la novedad ni a la actividad inventiva de la misma (artículos 6 y 7 de la LP) y se cita, únicamente a título informativo.

El documento D2 describe el uso del selenio (de 5 a 20 microgramos/g de pienso) para elaborar un alimento para peces con objeto de protegerlos de los efectos tóxicos que les producen las microcistinas, concretamente se menciona que el selenio actúa sobre la peroxidación lipídica y las enzimas antioxidantes. El documento D2 afecta, por tanto, a la novedad de las reivindicaciones 1, 2, 5, 6, 9, 11, 12 y 13 de la solicitud.

El resto de las reivindicaciones dependientes (3, 4, 7, 8 y 10) no aportan ninguna característica técnica que, en combinación con la reivindicación de la que dependen, le otorguen actividad inventiva, ya que se consideran meras cuestiones prácticas obvias para un experto en la materia.

En las reivindicaciones 3 y 4 se menciona el uso del selenio para prevenir, tratar y recuperar las alteraciones histopatológicas que produce la intoxicación con microcistinas. Teniendo en cuenta que el selenio forma parte de una de las enzimas antioxidantes con que el organismo se defiende del estrés oxidativo, la glutatión peroxidasa, es de esperar, que el tratamiento con una cantidad efectiva de selenio elimine o amortigüe cualquier efecto o consecuencia que se derive del estrés oxidativo celular, incluidas las alteraciones histológicas. De hecho, en el documento D3, el uso de un suplemento alimenticio de selenio demostró ser útil para proteger a ratones frente a la toxicidad con microcistinas. Este tratamiento disminuyó la peroxidación lipídica y las alteraciones histopatológicas producidas en el hígado de los ratones. Una vez demostrada la utilidad del selenio en un grupo de animales para tratar una enfermedad o problema, como es la intoxicación por microcistinas, el experto en la materia utilizaría este mismo producto en otros grupos de animales, por ejemplo en los peces, para tratar el mismo problema con razonables probabilidades de éxito. Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 1 a 13 carecen de actividad inventiva a la vista del documento D3.

Hoja adicional

Por último, el problema que trata de resolver la solicitud es encontrar un producto que elimine los efectos tóxicos de las microcistinas producen en los peces. Muchos de los documentos del estado de la técnica, incluida la propia solicitud, ponen de manifiesto que estos efectos tóxicos se basan en el estrés oxidativo que estas toxinas producen en los peces. Así pues, para un experto en la materia que buscara medicamentos para prevenir o tratar la intoxicación con microcistinas, resultaría obvio probar con aquellos fármacos que han mostrado su utilidad en peces ante un problema semejante, es decir la intoxicación con otros tóxicos que produzcan también estrés oxidativo. Dado que los documentos D4, D5 y D6, demuestra la utilidad del selenio como protector frente al estrés oxidativo producido por productos tóxicos de diversa índole (organofosforados, cadmio, cromo, cobre), se considera, que cada uno de estos documentos D4, D5 y D6 afecta a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 13 de la solicitud.