



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 340 012**

② Número de solicitud: 200803360

⑤ Int. Cl.:

A61K 31/198 (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;**
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**

⑳ Título: **Uso de N-acetilcisteína para proteger a los peces de la intoxicación por microcistinas.**

㉑ Resumen:

Uso de N-acetilcisteína para proteger a los peces de la intoxicación por microcistinas.

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende N-acetilcisteína (NAC) 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 2 340 012 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de N-acetilcisteína para proteger a los peces de la intoxicación por microcistinas.

5 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende N-acetilcisteína (NAC) 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 La NAC, derivado acetilado del aminoácido L-cisteína, es un conocido antioxidante que contiene grupos tiol.

15

Las aplicaciones de la NAC se basan en que puede actuar frente al estrés oxidativo por diferentes caminos. Es un precursor de la síntesis de GSH actuando como proveedor de cisteína y estimulando la actividad de las enzimas citosólicas involucradas en el ciclo del GSH, tales como Glutación reductasa (GR), que aumenta la tasa de regeneración de GSH. Por otro lado, *in vivo* e *in vitro* actúa directamente, a través de su grupo tiol, sobre diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como ácido hipocloroso, radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno (Aruoma O.I. *et al.* (1989) *Free Rad. Biol. Med.* 6:593-597).

20

Se ha descrito que la inyección de NAC mejora el estado redox de GSH en el hígado de anguilas (*A. anguilla*) intoxicadas con organofosforados (diclorvos), incrementando su tolerancia al estrés oxidativo y la necrosis provocadas por ingesta de pesticidas, particularmente en el caso de organofosforados o piretroides. Su uso queda restringido a esa aplicación y además sólo se hace referencia a las funciones de NAC frente al estrés oxidativo (ES2249167 A1).

25

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 pues afectan no sólo al hígado sino también al riñón, corazón, branquias, piel, médula y/o sangre, alterando además su comportamiento y desarrollo. Las cianobacterias constituyen parte de la dieta de diversos ciprínidos y cíclidos, como es el caso, por ejemplo, de las 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.

35

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 a 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.

55

Explicación de la invención

60 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende NAC 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.

65

ES 2 340 012 A1

La NAC administrada en esta invención se muestra efectiva 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.

5 Además, el uso de NAC como aditivo alimentario no sólo 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 branquias.

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

15 NAC es el derivado N-acetil del aminoácido L-cisteína. La NAC es el precursor del glutatión. El glutatión tiene un grupo tiol (sulfhidrilo) que le confiere efectos antioxidantes por medio de la reducción de radicales libres.

20 La composición de la presente invención comprende, al menos, NAC. El medicamento está compuesto, al menos, por la composición anterior. La NAC, 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 MCs.

25 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) NAC.

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.

30 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 producido por la acción de la NAC. El medicamento también se emplea para la recuperación de los efectos tóxicos ocasionados en peces expuestos a MC.

35 El término “efectos tóxicos” tal como se entiende en la presente invención hace referencia a la consecuencia derivada de la exposición del pez a las MCs, 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.

40 Las MCs son toxinas de estructura heptapeptídica producida 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-desmethytmicrocistina XR, (DMAAdda) 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).

45 Un segundo aspecto de la presente invención es el uso de una composición que comprende N-acetilcisteína 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 MC. 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.

65 En una realización preferida de la presente invención, los efectos tóxicos son alteraciones histopatológicas. El término “alteraciones histopatológicas” tal como se entiende en la presente invención son daños producidos en los tejidos biológicos del pez. Estos daños son detectados por medio de análisis a nivel microscópico de las estructuras patológicas de las diferentes muestras obtenidas, sin excluir otras técnicas de detección.

ES 2 340 012 A1

Una realización aún más preferida de la invención, es el uso 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. 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.

En otra realización más preferida de la presente invención, la NAC se administra en una cantidad diaria de entre 400 y 880 mg por Kg de peso del pez. Esta administración se lleva a cabo durante al menos una semana. Preferiblemente la cantidad diaria incorporada a los peces es de entre 600 y 880 mg por Kg de peso. Tal como los inventores han determinado, la administración de cantidades diarias superiores a 800 mg por Kg de peso de pez, pueden ocasionar alteraciones hepáticas en los peces (esteatosis), renales (atrofia, degeneración), cardíacas (miofibrosis) e intestinales (pérdida de microvellosidades).

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 presente invención, comprende el uso de la composición anteriormente 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, NAC), 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.

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.

La NAC 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 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.

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

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.

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 pueden seleccionar, sin limitarse, a 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*, *O. spilurus niger*, *O. spilurus percivali*, *O. spilurus spilurus*, *O. squamipinnis*, *O. tanganyicae*, *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 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.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de NAC sobre la LPO en hígado y riñón de tilapias expuestas a 120 µg MC/pez.

Fig. 1A.- Medidas de LPO en hígado. Fig. 1B.- Medidas de LPO en riñón.

Donde: el eje Y representa los valores de LPO (peroxidación lipídica) cuantificados como sustancias de degradación de la peroxidación de los lípidos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS) expresados en nmol TBARS/g de tejido ± error estándar (n=8). Los niveles de significación, es decir, que al comparar entre los grupos seleccionados la diferencia entre ellos sea estadísticamente significativa para lo cual el parámetro p debe ser menor de 0.05 ($p < 0.05$), son los siguientes: (a) en comparación con el grupo control (grupo 1), (b) en comparación con el grupo 2, sólo MC; (c) comparación del grupo tratado con MC y NAC con el grupo tratado sólo con NAC, y (f) comparación del grupo de peces tratado con MC y una dosis de NAC de 1936 mg NAC/Kg pez/día con un grupo de peces tratados con MC y una dosis de NAC 880 mg NAC/Kg pez/día.

Fig. 2. Muestra los cambios histopatológicos en hígado de tilapias expuestas a MCs y su recuperación por NAC.

A, C, E, G, I, K, M, O: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 5, 100, 50, 50, 50, 50 y 50 µm, respectivamente. B, D, F, H, J, L, N, P: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 20, 10, 20, 20, 10, 5, 20 y 20 µm, respectivamente.

Fig. 3. Cambios histopatológicos en riñón de tilapias expuestas a MCs y su recuperación por NAC.

A, C, E, G, I, K, M, O: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 200, 100, 100, 50, 50, 50, 50 y 150 µm, respectivamente. B, D, F, H, J, L, N, O: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10, 50, 10, 10, 50, 50, 50 y 50 µm, respectivamente.

Fig. 4. Cambios histopatológicos en corazón de tilapias expuestas a MCs y su recuperación por NAC.

A, C, E, G, I, K, M, O: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden, 50 µm. B, D, F, H, J, L, N, P: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden, 10, 10, 30, 10, 10 y 10 µm, respectivamente.

Fig. 5. Cambios histopatológicos en intestino de tilapias expuestas a MC y su recuperación por NAC.

A, C, E, G, I, K, M, O: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden, 50 µm. B, D, F, H, J, L, N, P: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden, 10, 10, 10, 5, 10, 10, 5 y 10 µm, respectivamente.

Fig. 6. Cambios histopatológicos en branquias de tilapias expuestas a MC y su recuperación por NAC.

A, C, E, G, I, K, M, O: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden, 100 µm. B, D, F, H, J, L, N, P: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 500, 1000, 500, 500, 500, 500 y 500 µm, respectivamente.

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen el uso de NAC 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 + NAC durante 7 días.

Acuarios 4, 6 y 8: Peces con pienso + NAC (400, 880 y 1936 mg de NAC/Kg pez, respectivamente) durante 7 días. Los peces se intoxicaron con una dosis única de $120 \mu\text{g MC/pez}$.

Al final del experimento los peces fueron sacrificados, anestesiándolos con hielo. Se procedió a la extracción de los órganos, y se prepararon sus extractos para las determinaciones de biomarcadores enzimáticos, según Prieto *et al*. (2006, *Aquat. Toxicol* 77:314-321), concretamente la medida de la lipoperoxidación lipídica (LPO) se realizó midiendo los TBARS o sustancias de degradación de la peroxidación de los lípidos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico. Los estudios histológicos por microscopía óptica y electrónica en los distintos órganos se llevaron a cabo según Atencio *et al* (2008, *Toxicol Pathol* 36:449-458).

Para los estudios de significación estadística entre grupos, se empleó el análisis de la varianza (ANOVA) y posteriormente el ensayo de Tukey, con una significación estadística $p < 0,05$.

Los resultados más significativos fueron los siguientes:

1) En la Fig 1 se observa como las MCs incrementan la lipoperoxidación (LPO) en hígado (1,9 veces), y en riñón (1,4 veces) frente al control, y los efectos protectores de NAC se demuestran con todas las dosis ensayadas.

2) Las MCs disminuyen los cocientes GSH/GSSG en hígado de los peces intoxicados, y la aplicación de NAC mejoró este parámetro.

3) Las alteraciones de la actividad catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), Glutación peroxidasa (GPx), Glutación reductasa (GR) y Glutación transferasa (GST) fueron mejoradas por NAC, recuperando los valores del grupo control.

Ejemplo 2

NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en hígado

El estudio histopatológico del hígado de los peces pertenecientes al lote tratado con MC-LR puso de evidencia un proceso degenerativo que consistió en la presencia de cordones hepáticos formando células en cebolla característica de una degeneración glucogénica (Fig. 2C), frente a una ausencia de lesiones del grupo control (Fig. 2A, B). Al microscopio electrónico las células muestran núcleos redondeados, escaso citoplasma y la mayor parte de éste ocupado por glucógeno granular (Fig. 2D).

En los tres lotes de peces tratados exclusivamente con NAC se observó que, mientras que con las dosis más bajas (400 y 880 mg/kg) no existían lesiones hepáticas (Fig. 2E, F, G, H), los peces tratados con la dosis más alta (1936 mg/kg) desarrollaron un proceso de esteatosis observándose al microscopio óptico vacuolas de grasas en el citoplasma y al microscopio electrónico hepatocitos muy claros con presencia de vacuolas de grasa (Fig. 2I, J).

Estas lesiones se mantuvieron en el lote de peces a los que junto a la MC-LR se les administró 400 mg/kg de NAC, sin embargo es un proceso mucho más leve, y se intercalaron células acidófilas normales junto a células en cebolla (Fig. 1K). Al microscopio electrónico se observó la presencia de escaso glucógeno en el citoplasma (Fig. 2L).

El estudio estructural de los peces del lote a los que junto con la MC se les administró una dosis de 880 mg/kg de NAC, mostró una recuperación de las lesiones provocadas por la MC, ya que éstas no aparecieron en estos peces (Fig. 2M, N), sin embargo a los que se les administró junto con la MC una dosis de 1936 mg/Kg de NAC presentaron un proceso de esteatosis similar al lote de peces tratados únicamente con esta misma dosis de NAC, observándose hepa-

ES 2 340 012 A1

tocitos con citoplasma claro y zonas muy vacuolizadas debido a la presencia de grasa (Fig. 2O). Al microscopio electrónico se confirman estas lesiones presentándose en el último lote abundantes vacuolas de grasas muy pleomórficas (Fig. 2P).

5 A, B: Hígado de los peces control. A. Cordones hepáticos normales, morfología poliédrica con núcleo central y citoplasma claro. B. Detalle de hepatocito aparentemente normal, con organoides citoplasmáticos, retículos (círculo), mitocondrias (flecha).

10 C, D: Tilapias expuestas sólo a Microcistinas (120 µgMC/pez.) C. Parénquima hepático desorganizado, cordones de hepatocitos a modo de células en cebolla (círculo). D. El hepatocito presenta un núcleo denso normal (N) rodeado de un escaso citoplasma (flecha) repleto de glucógeno granular (círculo).

15 E, F: Tilapias expuestas solo a NAC (dosis baja, 400 mg/kg). E. Parénquima hepático con cordones hepatocitos aparentemente normal (círculo). F. El hepatocito con un citoplasma con mitocondrias aparentemente normal (flecha), lisosomas (círculo) y escaso glucógeno granular (estrella).

20 G, H: Hígado de tilapias tratadas solo con NAC (dosis media, 880 mg/kg). G. Parénquima con hepatocitos aparentemente normales dispuestos en cordones (flecha) H. Hepatocitos normales con un desarrollo normal de los organoides citoplasmáticos, mitocondrias (flecha), y escaso glucógeno (estrella).

I, J: Hígado de tilapias tratadas con dosis alta de NAC (1936 mg/kg). I. Hepatocitos en cordones con vacuolas de grasa en el citoplasma (flecha). J. Hepatocito con citoplasma muy claro y presencia de vacuolas grasas (estrella).

25 K, L: Hígado de peces tratados con MC-LR+ NAC (400 mg/kg). K. Hepatocitos en cordones con morfología aparentemente normal (círculo). L. Hepatocito con citoplasma claro (flecha) rodeando al núcleo (N) y presencia de glucógeno (círculos).

30 M, N: Hígado de peces tratados con MC-LR+NAC (880 mg/kg). M. Parénquima con hepatocitos en cordones y con citoplasma aparentemente normal (círculo). N. Hepatocitos con abundantes mitocondrias (flecha) asociadas al Retículo endoplásmico rugoso (RER) (estrella).

35 O, P: Hígado de peces tratados con MC-LR+NAC (1936 mg/kg). O. Parénquima hepático con hepatocitos con citoplasma claro y con numerosas vacuolas de grasa (círculo). P. Hepatocito alterado con presencia de vacuolas de grasas muy pleomórficas (círculo).

Ejemplo 3

NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en riñón

40 Morfológicamente los riñones de los peces del lote tratados con MC-LR mostraron una degeneración glomerular caracterizada por una atrofia del glomérulo, dilatación de la capsula de Bowman, hiperemia y hemorragia en el parénquima renal (Fig. 3C), y al microscopio electrónico, por la presencia de membranas basales irregulares y con zonas de hialinización podocitaria (Fig. 3D). Los riñones de los peces del lote control presentaron una estructura aparentemente normal (Fig. 3A, B).

50 El estudio de los peces de los lotes tratados solamente con las dosis más bajas de NAC (400 y 880 mg/kg, respectivamente) no mostraron ninguna lesión renal (Fig. 3E, F, G, H). Sin embargo, con la dosis más alta (1936 mg/kg) los riñones presentaron un proceso de degeneración atrófica glomerular, observándose al microscopio electrónico un engrasamiento e irregularidad de las membranas basales de los capilares (Fig. 3I, J).

55 En los peces a los que se les administró MC junto con 400 mg/ kg de NAC se observaron al microscopio óptico ciertas lesiones consistentes en ligeras hiperemias y microhemorragias (Fig. 3K), y al microscopio electrónico, una ligera tumefacción de la pared endotelial (Fig. 3L). En el lote de peces tratados con MC y 880 mg/kg de NAC se observó estructuralmente y ultraestructuralmente una morfología del parénquima renal totalmente normal (Fig. 3M, N). Sin embargo, aquellos a los que se le suministró MC y 1936 mg/kg de NAC mostraron un proceso de atrofia y degeneración membranosa glomerular junto con ciertos procesos de hiperemia y microhemorragias (Fig. 3O, P).

60 A, B: Riñón de los peces control.

65 C, D: Histología de peces tratados con MC-LR. C. Detalle de parénquima renal con glomérulos atrofeos, hialinizados e hiperémicos con dilatación de la capsula de Bowman (flecha). Hiperemia (círculo) y hemorragias (estrella) en el parénquima renal. D. Glomérulo renal con engrasamiento e irregularidad de las membranas basales (flecha) con zonas de hialinización podocitaria (círculo).

E, F: Tilapias expuestas sólo a NAC (dosis baja, 400 mg/kg). E. Parénquima renal con glomérulo renal (círculo) aparentemente normal y ligeras hemorragias (flecha). F. Detalle del glomérulo renal normal con ligera tumefacción de la pared endotelial (círculo).

ES 2 340 012 A1

G, H: Tilapias expuestas sólo a NAC (dosis media, 880 mg/kg). G. Glomérulo de tamaño y morfología normal (círculo). H. Glomérulo renal aparentemente normal con las membranas basales distribuidas correctamente (círculo).

5 I, J: Histología del riñón de tilapias tratadas con dosis alta de NAC (1936 mg/kg). I. Atrofia de glomérulos (círculo), hialinizados e hiperámicos (flecha). J. Engrasamiento e irregularidades de las membranas basales del glomérulo renal (círculo).

10 K, L: Histología del riñón de peces tratados con MC-LR+ NAC (400 mg/kg). K. Detalle del parénquima renal prácticamente normal, con hiperemia (flecha) y ligeras hemorragias (estrella). L. Glomérulo renal con tumefacción de las células endoteliales (círculo).

M, N: Histología del riñón de peces tratados con MC-LR+NAC (880 mg/kg). M. Detalle del parénquima renal prácticamente normal. N. Glomérulo renal sin modificación de las membranas basales (círculo).

15 O, P: Histología del riñón de peces tratados con MC-LR+NAC (1936 mg/kg). O. Parénquima renal con glomérulos hialinizados e hiperémicos (círculo), y dilatación de la capsula de Bowman (flecha). Hemorragias (estrella). P. Degeneración membranosa con grumos irregulares (flecha) e hialinización podocitaria muy marcada (círculo).

20 Ejemplo 4

NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en corazón

25 El estudio histopatológico realizado sobre peces tratados con MC-LR mostraron estructuralmente a nivel de corazón un proceso de miofibrosis, tumefacción y cierta presencia de grasa. Ultraestructuralmente se apreció claramente esta miofibrosis de la fibra cardíaca, caracterizada por una pérdida de gran parte del material contráctil (Fig. 4C, D).

30 Los peces tratados con las dosis más bajas de NAC (400 y 880 mg/kg) presentan una morfología de las fibras cardíacas similares a las del grupo control (Fig. 4E, F, G, H) mientras que las del lote del grupo a los que se les administró la dosis más alta de NAC (1936 mg/kg), presentaron al microscopio óptico tumefacción y miofibrosis de las fibras cardíacas junto con procesos de microhemorragias (Fig. 4I). Al microscopio electrónico se apreció en este último lote una desintegración parcial de las miofibrillas (Fig. 4J).

35 Los procesos degenerativos en corazón que se observaron en los peces tratados con MC-LR fueron mucho más leves en aquellos peces tratados con suplemento de NAC a la dosis más baja (400 mg/kg) (Fig. 4K, L) y no se observaron lesiones en los tratados con la dosis intermedia (880 mg/kg) (Fig. 3M, N), sin embargo, en aquellos a los que se les suministró además de la MC la dosis más alta de NAC (1936 mg/kg) mostraron un proceso de miofibrosis con deflecación de las miofibrillas y cierta grasa intersticial observado al microscopio óptico (Fig. 3O), y ultraestructuralmente se apreciaron las fibras cardíacas con degeneración y desintegración de las miofibrillas (Fig. 40 3P).

A, B: Corazón de peces control.

45 C, D: Histología del corazón de peces tratados con MC-LR. C. Tumefacción de miofibrilla (círculo) con deflecación de las mismas (flecha) y zona de almacenamiento grasa (estrella). D. Pérdida y desintegración de las miofibrillas (círculo).

50 E, F: Corazón de peces tratados con NAC (dosis baja, 400 mg/kg). E. Detalle de corazón con fibras aparentemente normal (círculo). F. Estructura de las miofibrillas prácticamente normal (círculo).

G, H: Corazón de tilapias expuestas solo a NAC (dosis media, 880 mg/kg). G. Fibras musculares aparentemente normales. H. Miofibrillas aparentemente normales (círculo).

55 I, J: Histología del corazón de tilapias tratadas con dosis alta de NAC (1936 mg/kg). I. Tumefacción de las fibras (círculo) con deflecaciones de las mismas (estrella) y microhemorragias (flechas). J. Fibras con desintegración parcial de las miofibrillas (círculos).

60 K, L: Histología del corazón de peces tratados con MC-LR+NAC (400 mg/kg). K. Detalle de miocardio con zonas de fibrillas musculares deflecadas (círculo) y microhemorragias escasas (flecha). L. Desorganización fibrilar (flechas) y concentraciones de mitocondrias (círculo).

65 M, N: Histología del corazón de peces tratados con MC-LR+NAC (880 mg/kg). M. Detalle de corazón con fibras musculares aparentemente normal. N. Fibra cardíaca con miofibrillas normales (flecha) y concentraciones de mitocondrias muy activas (círculo).

O, P: Histología del corazón de peces tratados con MC-LR+NAC (1936 mg/kg). O. Deflecación de miofibrillas (círculo) y cierta grasa intersticial (flechas). P. Degeneración y desintegración de las miofibrillas (círculo).

Ejemplo 5

NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en intestino

5 A nivel de intestino en los peces tratados con MC-LR se observaron lesiones, frente al lote control (Fig. 5A, B), caracterizadas por un proceso de enteritis necrótica con la presencia, al microscopio óptico, de enterocitos necrosados y descamación parcial de las vellosidades (Fig. 5C), y al microscopio electrónico, una pérdida de microvellosidades (Fig. 5D).

10 Tras la administración de las diferentes dosis de NAC (400, 880 y 1936 mg/kg) solo se observaron ciertas lesiones en la dosis más alta (1936 mg/kg), que consistieron en un proceso de necrosis y degeneración del enterocito, con células en necrosis y zonas de las vellosidades descamadas (Fig. 5E, F, G, H, I, J).

15 Los peces a los que se les administró NAC junto con la MC-LR mostraron una protección (400 y 880 mg/kg) con una estructura aparentemente normal cuando fueron observadas tanto al microscopio óptico como electrónico (Fig. 4K, L, M, N). Sin embargo, con la suplementación con la dosis más alta de NAC (1936 mg/kg) se observaron procesos de necrosis y degeneración del hepatocito, detectándose al microscopio óptico vellosidades intestinales con necrosis y descamación (Fig. 5O) y al microscopio electrónico, pérdida de microvellosidades (Fig. 5P).

20 A, B: Intestino de peces control. A. Vellosidades aparentemente normales con enterocitos aparentemente normales. B. Enterocitos con abundantes microvellosidades (círculo) aparentemente normales.

25 C, D: Histología de intestino de tilapias tratadas con MC-LR. C. Detalle de vellosidades intestinales con enterocitos necrosados (flecha) y descamación parcial (círculo). D. Alteración de los enterocitos con pérdida parcial (círculo) y total (flecha) de las microvellosidades.

E, F: Intestino de peces tratados con NAC (dosis baja, 400 mg/kg). E. Vellosidades aparentemente normales (círculo). F. Células intestinales aparentemente normales (círculo).

30 G, H: Intestino de Tilapias expuestas solo a NAC (dosis media, 880 mg/kg). G. Vellosidades aparentemente normales (círculo). H. Recuperación del epitelio con abundantes microvellosidades (círculo).

I, J: Intestino de tilapias tratadas con dosis alta de NAC (1936 mg/kg). I. Detalle de vellosidades intestinales con la zona apical necrosada (flecha) y descamada parcialmente (círculo). J. Zonas de descamación de la microvellosidades (círculo).

35 K, L: Histología del intestino de peces tratados con MC-LR+NAC (400 mg/kg). K. Detalle de vellosidades intestinales con pequeñas zonas de enterocitos necrosados (flechas). L. Zona apical del enterocito con alteración de las microvellosidades (círculo).

40 M, N: Intestino de peces tratados con MC-LR+NAC (880 mg/kg). M. Vellosidades intestinales normales (círculo). N. Zonas de enterocitos aparentemente normales con microvellosidades recuperadas (círculo).

45 O, P: Intestino de peces tratados con MC-LR+NAC (1936 mg/kg). O. Vellosidades intestinales con necrosis (flecha) y descamación de las células intestinales (círculo). P. Enterocitos alterados con pérdida de la microvellosidades intestinales (círculo).

Ejemplo 6

NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en branquias

50 Al microscopio óptico las branquias de los peces tratados con MC presentaron, a nivel de las laminillas primarias y secundarias, procesos de hiperemia y hemorragias, y al microscopio electrónico de barrido se observó una alteración de la morfología con pérdida de continuidad del arco branquial, descamación y presencia de componentes sanguíneos extravasados (Fig. 6B, C). Estas lesiones no fueron observadas en el lote control, que presentó una morfología aparentemente normal (Fig. 5A, B).

60 En los tres lotes de peces tratados exclusivamente con NAC no se observaron lesiones en las branquias con las dosis más bajas (400 y 880 mg/kg) (Fig. 6E, F, G, H), pero los peces tratados con la dosis más alta (1936 mg/kg) mostraron alteraciones tales como zonas de hemorragias e hiperemia tanto en las laminillas primarias como secundarias (Fig. 6I). En este último lote, las branquias observadas mediante microscopio electrónico de barrido presentaron zonas de descamación en las laminillas primarias y deflecaciones en las laminillas secundarias, además de presencia de elementos formes sanguíneos extravasados (Fig. 6J).

65 Los peces tratados con MC y 400 mg/kg de NAC, mostraron recuperación de las lesiones provocadas por la MC, ya que presentaron ligeras hiperemias y ciertas descamaciones en las laminillas (Fig. 6K, L), aunque la protección es máxima en aquellos peces a los que se les administró 880 mg/kg de NAC ya que no se observaron lesiones en estos peces (Fig. 6M, N). Sin embargo, a los peces que se les administró MC y 1936 mg/Kg de NAC presentaron procesos de

ES 2 340 012 A1

hiperemia y hemorragias en el arco bronquial observados mediante el microscopio óptico (Fig. 6O), y al microscopio electrónico de barrido se apreció una descamación de las láminas primarias y tumefacción de las laminillas secundarias (Fig. 5P).

5 A, B: Branquias de peces control.

C, D: Branquias de peces tratados con MC-LR. C. Detalle de filamento branquial con presencia de hiperemia (círculo) y hemorragias (flecha) en laminillas primarias y secundarias. D. Arco branquial con pérdida de continuidad y presencia de componentes sanguíneos extravasados (círculo).

10

E, F: Histología de branquias de peces tratados con NAC (dosis baja, 400 mg/kg). E. Filamentos branquiales aparentemente normales. F. Detalle de laminillas primarias y secundarias aparentemente normales.

15

G, H: Branquias de peces tratados con NAC (dosis media, 880 mg/kg). G. Filamentos branquiales aparentemente normales. H. Detalle de laminillas primarias y secundarias aparentemente normales.

20

I, J: Histología de branquias de peces con dosis alta de NAC (1936 mg/kg). I. Laminillas primarias con zonas de hemorragias (flecha) e hiperemia (estrella). J. Laminillas primarias con zonas de descamación y presencia de elementos sanguíneos extravasados (círculo). Defleción de las laminillas secundarias (flecha).

K, L: Histología de branquias de peces tratados con MC-LR+ NAC (400 mg/kg). K. Laminillas primarias y secundarias con ligera hiperemia (flecha) y hemorragias (estrella). L. Laminas primarias con ligera descamación (círculo) y láminas secundarias aparentemente normales (flecha).

25

M, N: Branquias de peces tratados con MC-LR+NAC (880 mg/kg). M. Filamentos branquiales aparentemente normales. N. Laminillas primarias y secundarias aparentemente normales.

30

O, P: Branquias de peces tratados con MC-LR+NAC (1936 mg/kg). O. Procesos hemorrágicos en el arco branquial (círculo), y presencia de hiperemia en lámina primaria y secundaria (flecha). P. Descamación, hemorragia y tumefacción de las láminas primarias (flecha).

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 340 012 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende N-acetilcisteína 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 N-acetilcisteína 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 la N-acetilcisteína se administra en una cantidad diaria de entre 400 y 880 mg por Kg de peso del pez.
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

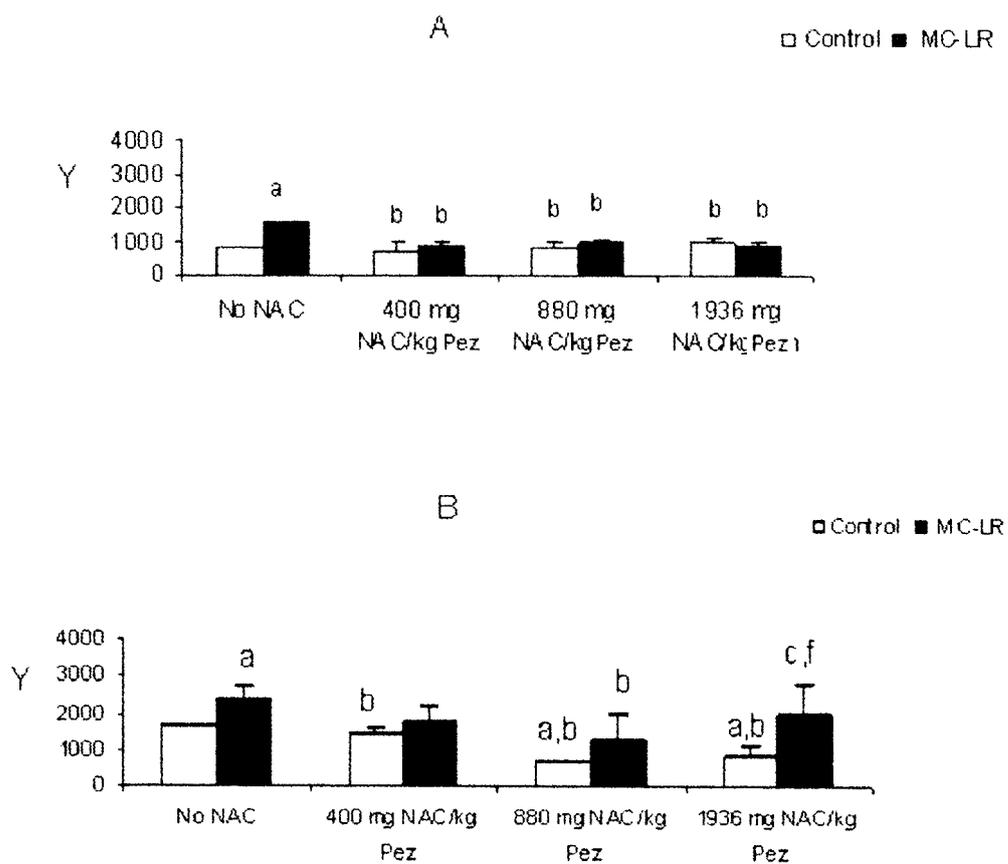


FIG. 1

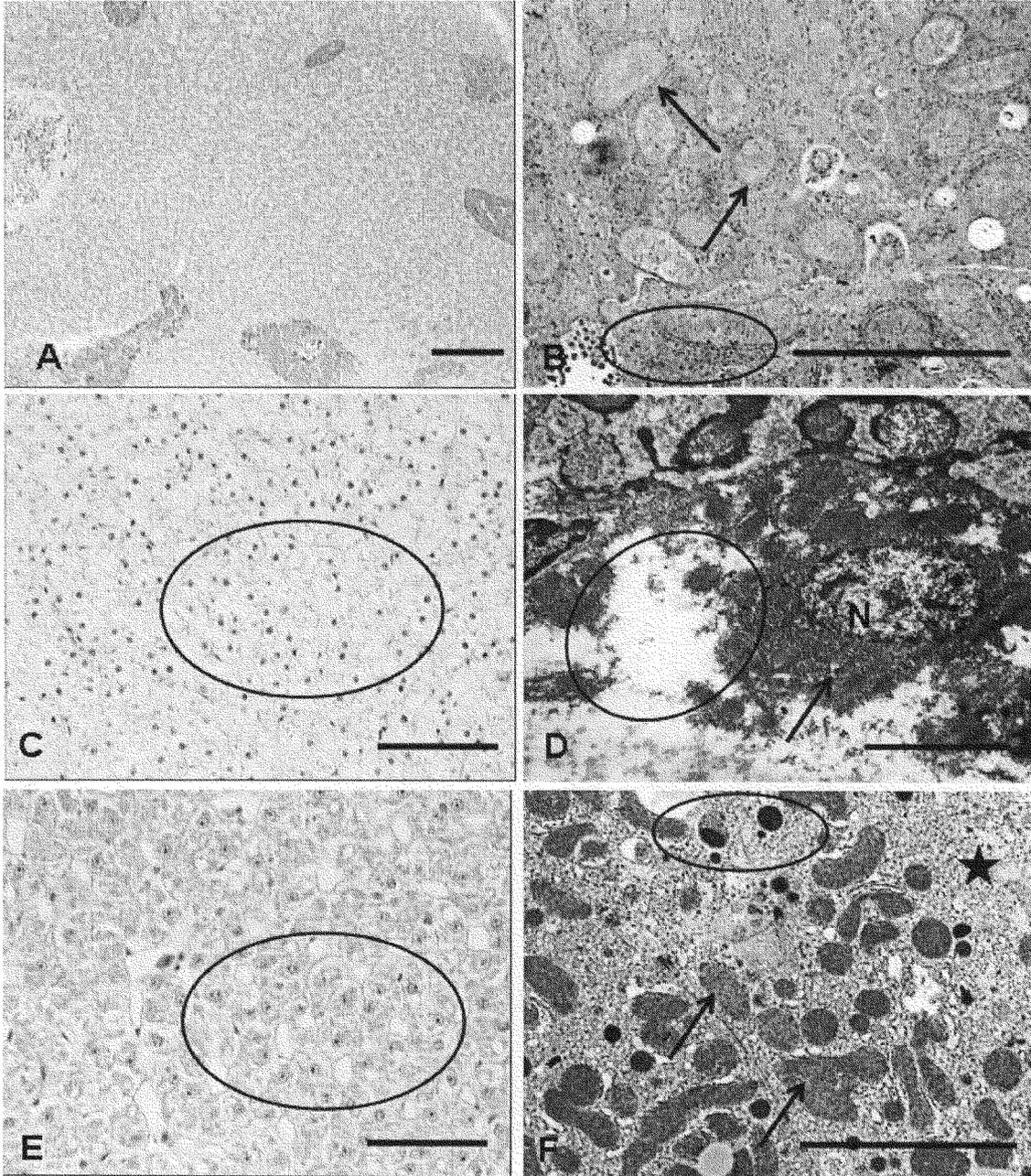


FIG. 2

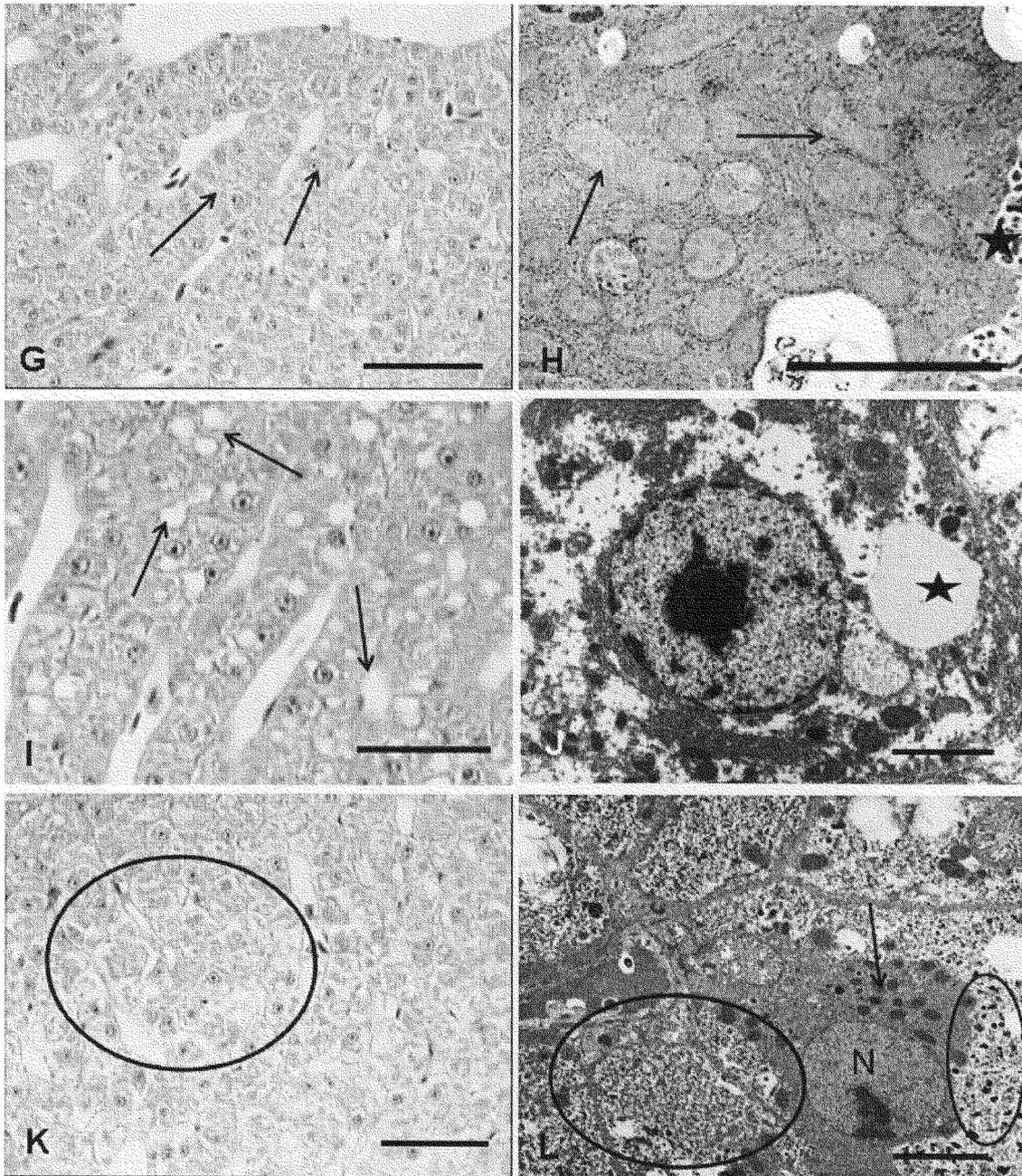


FIG. 2 (Cont.)

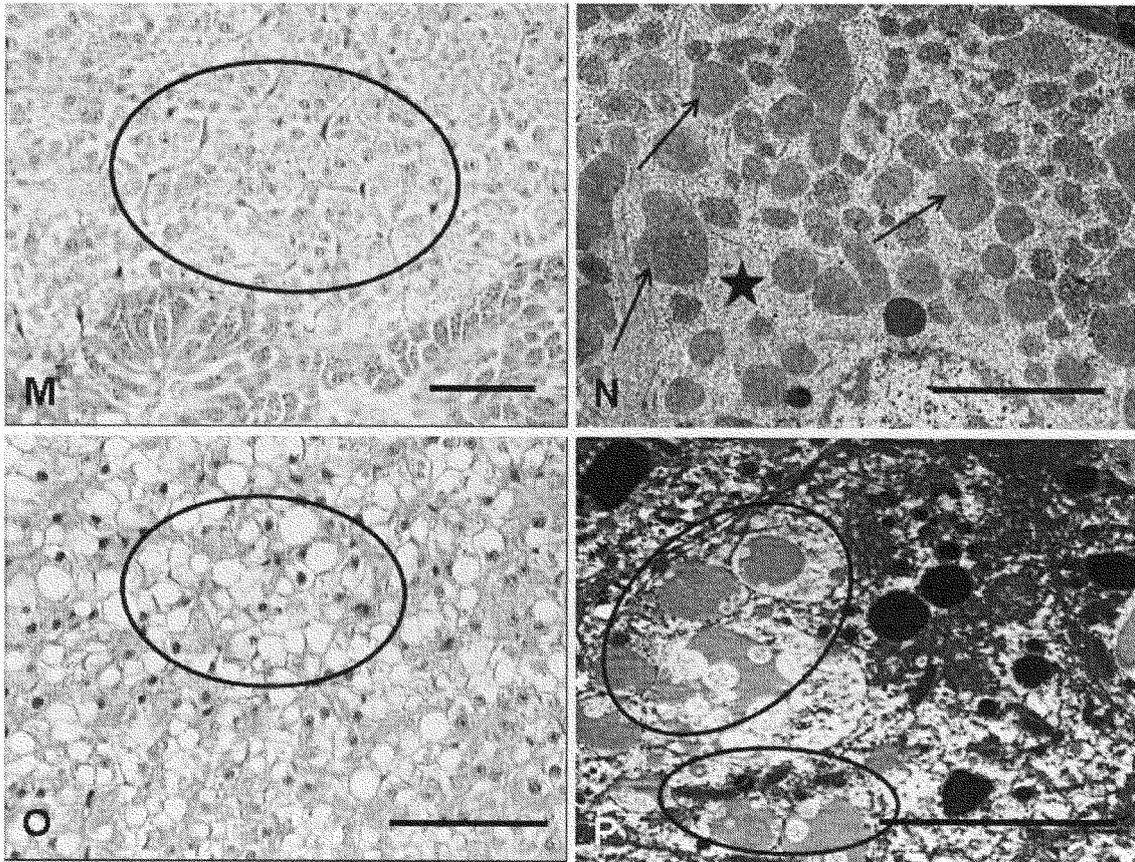


FIG. 2 (Cont.)

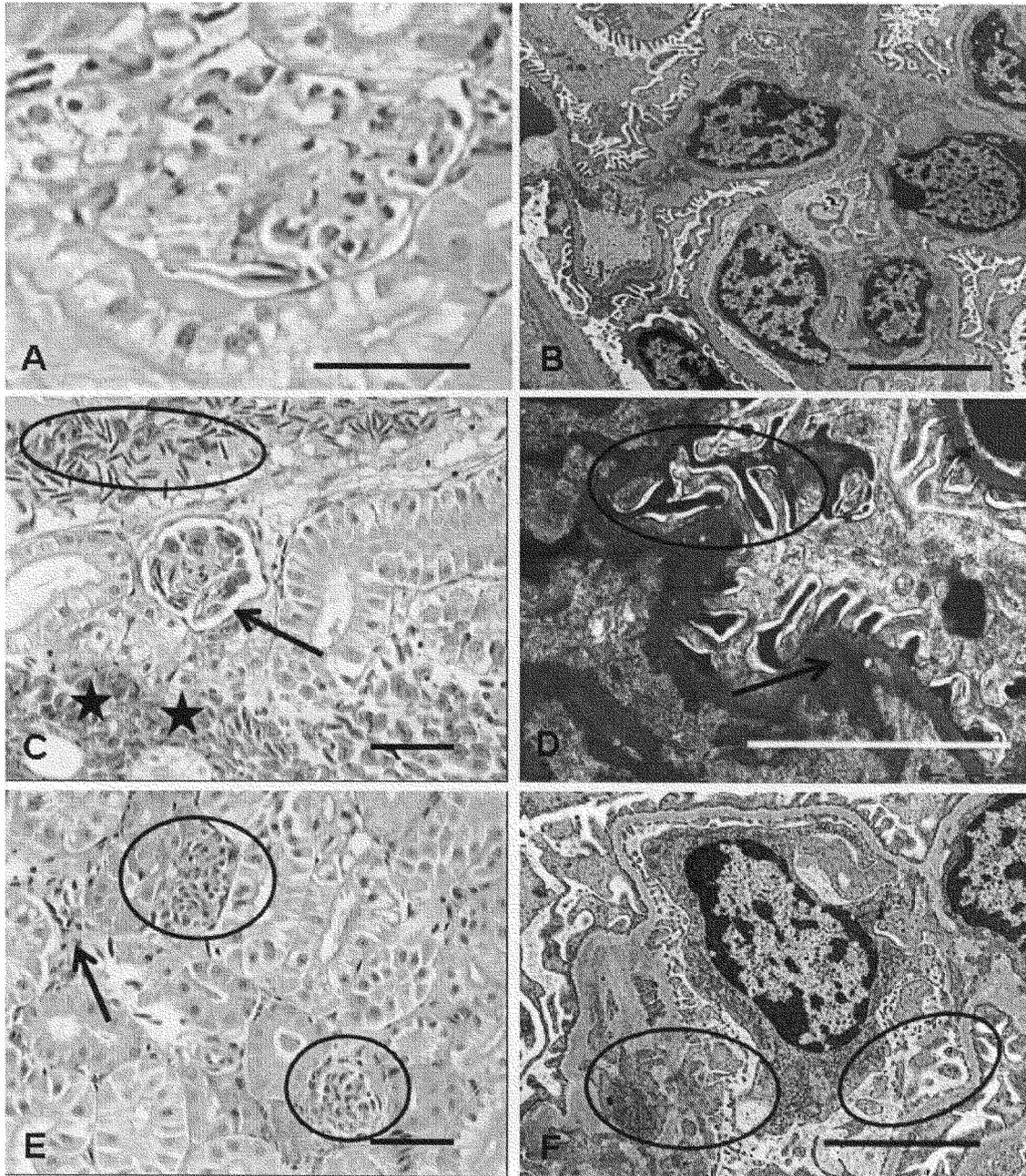


FIG. 3

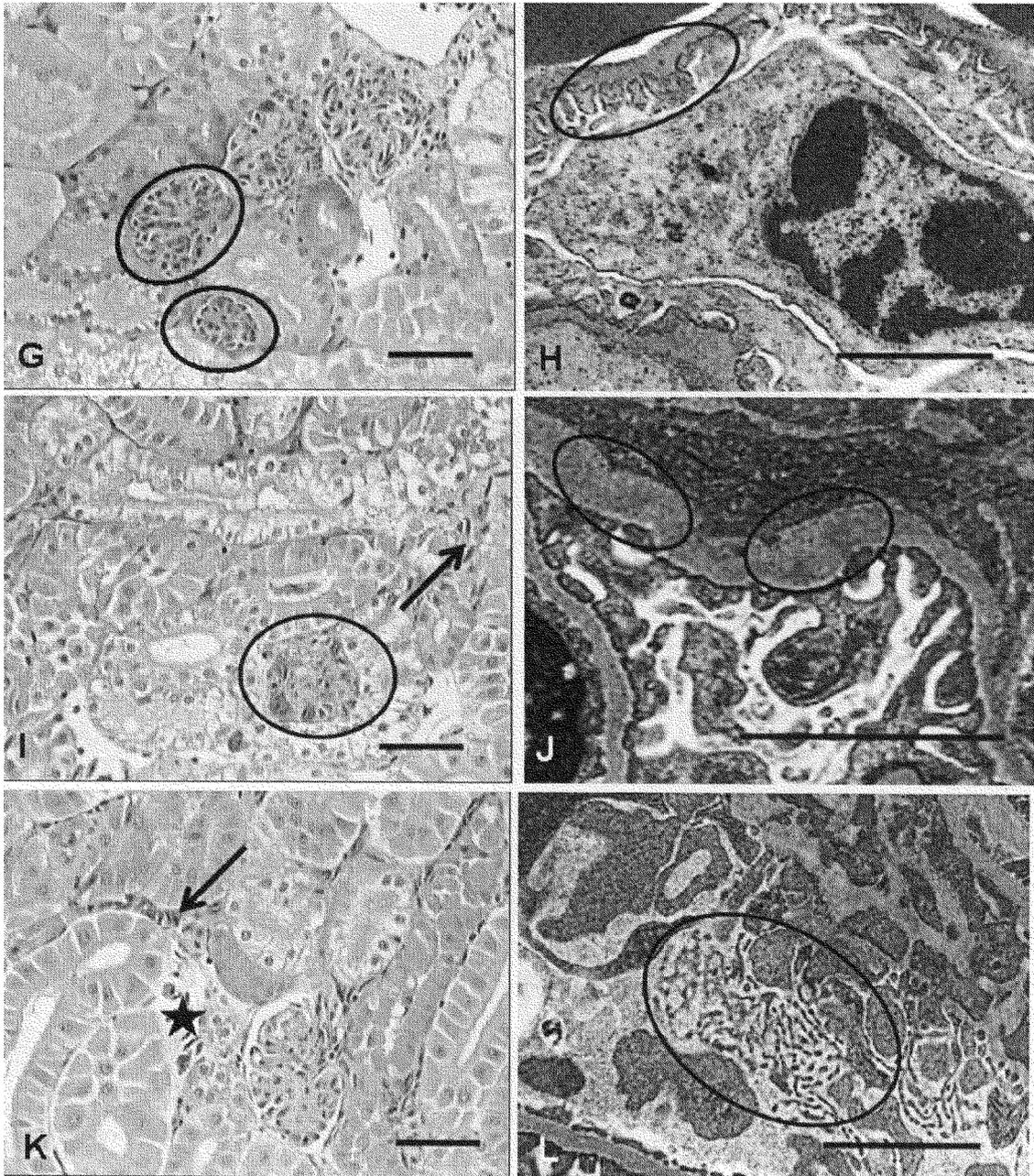


FIG. 3 (Cont.)

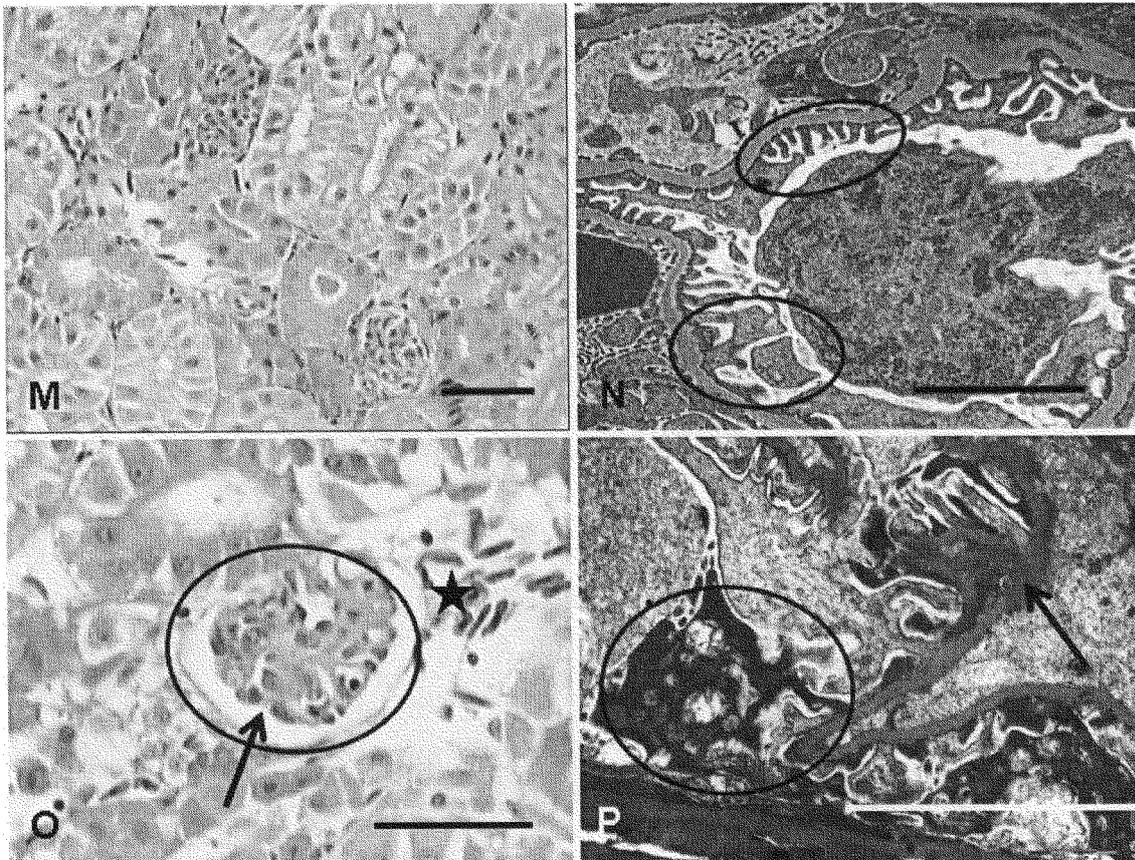


FIG. 3 (Cont.)

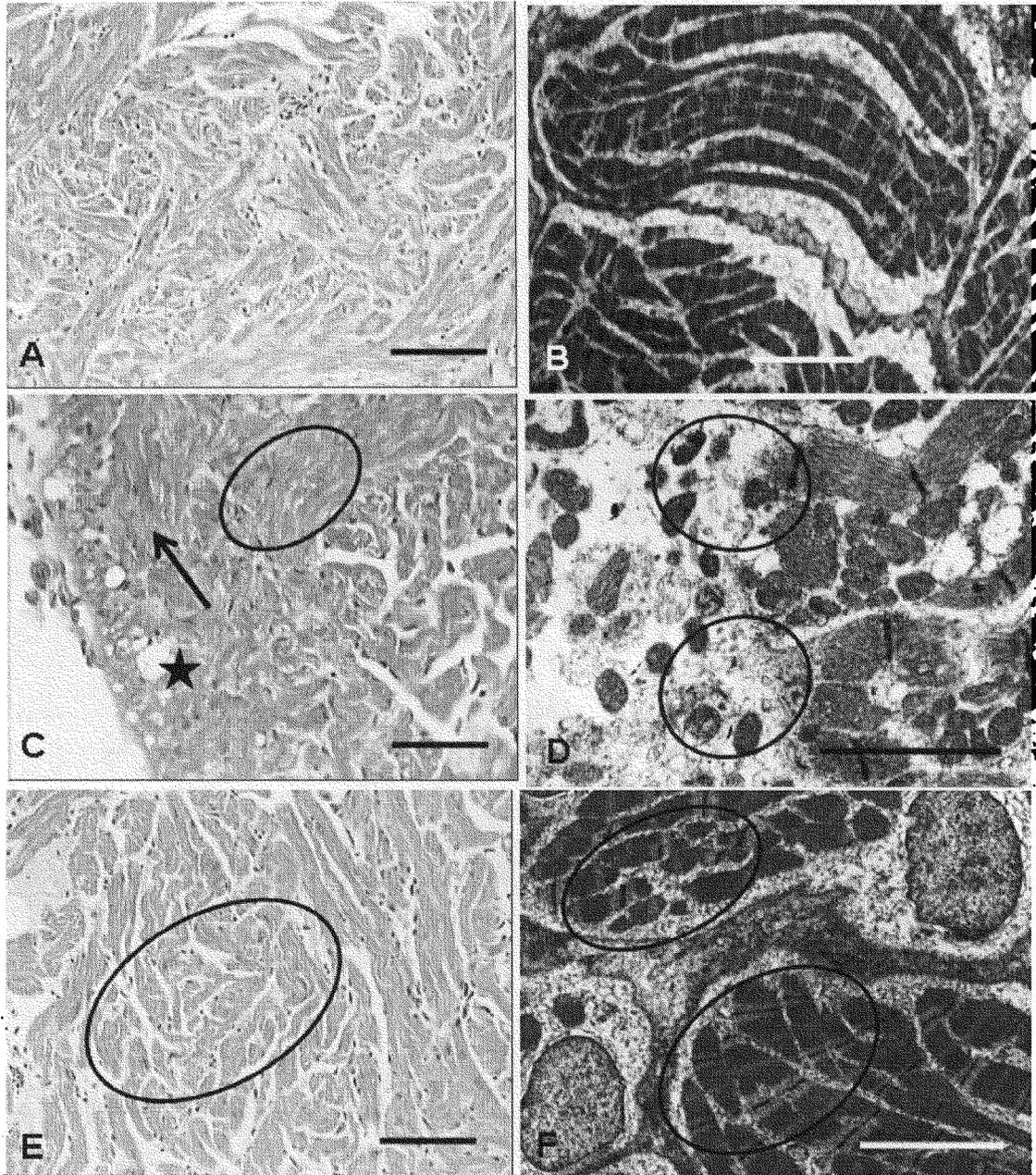


FIG. 4

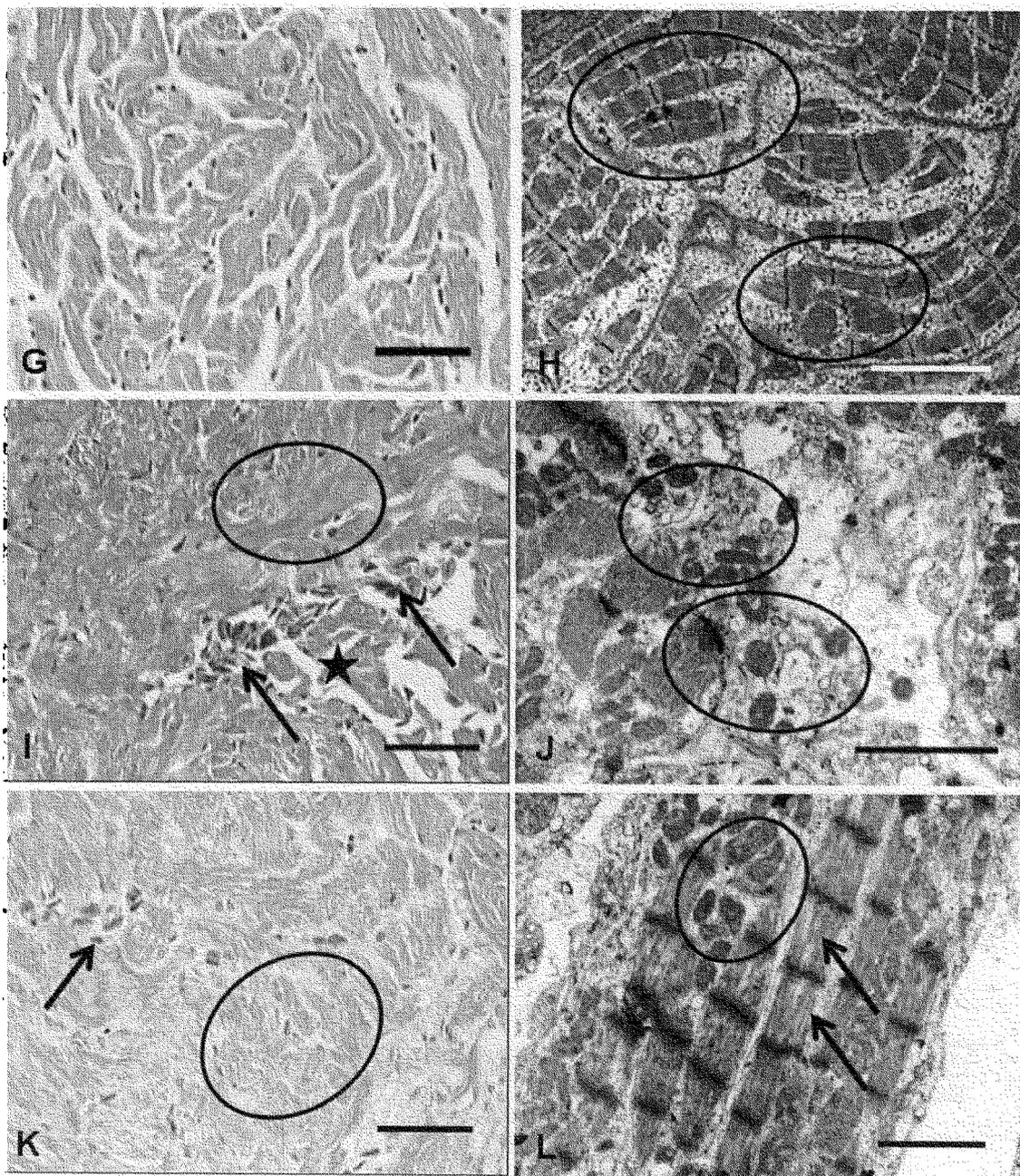


FIG. 4 (Cont.)

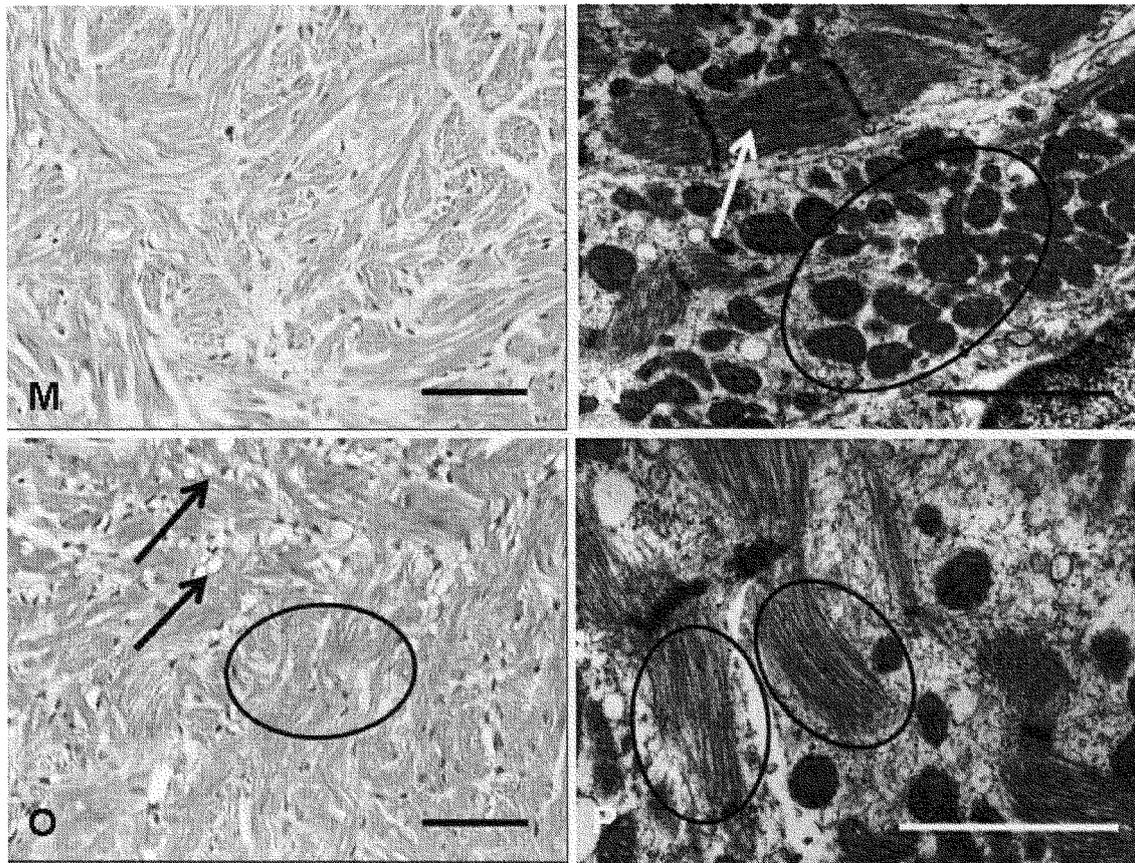


FIG. 4 (Cont.)

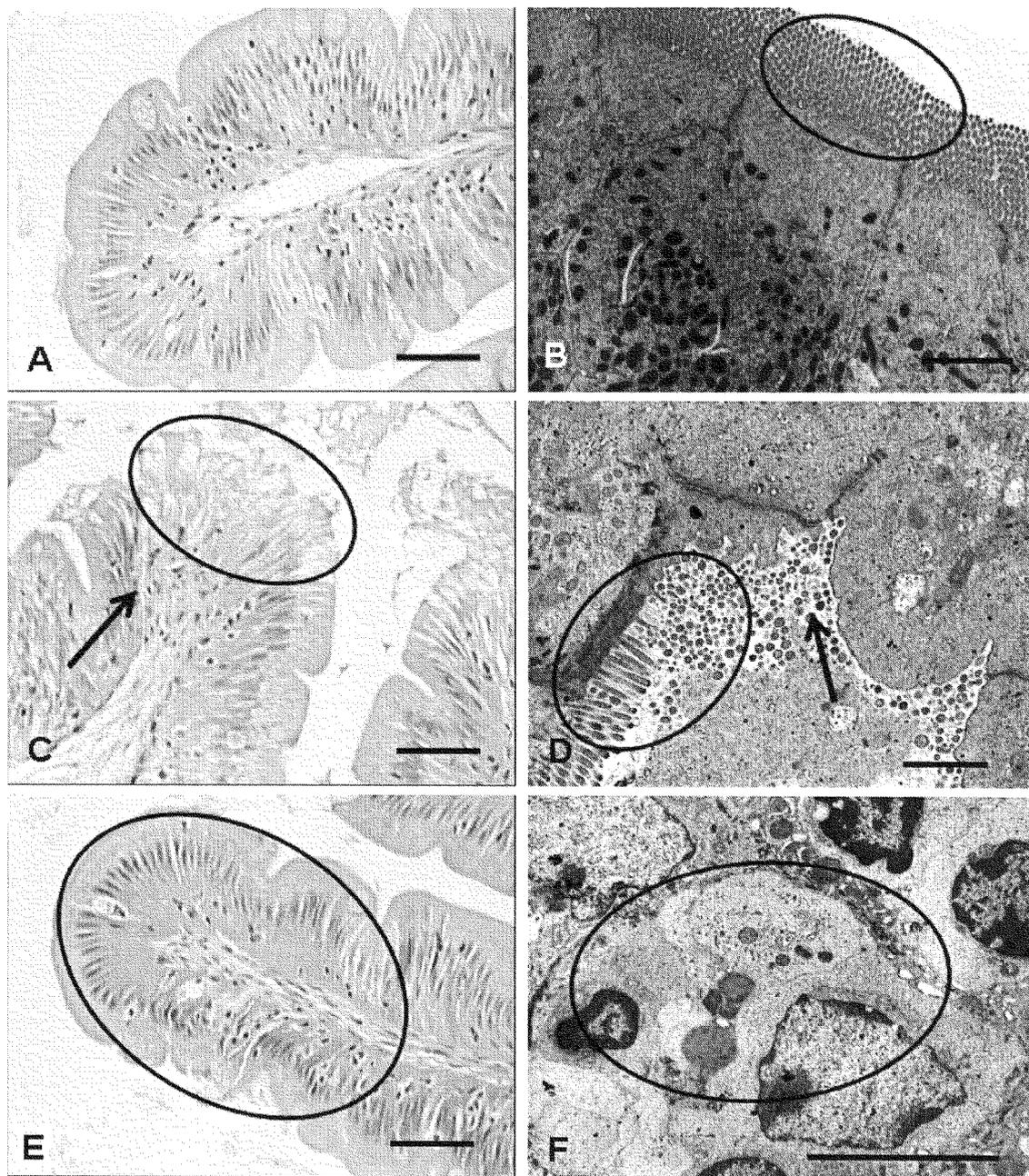


FIG. 5

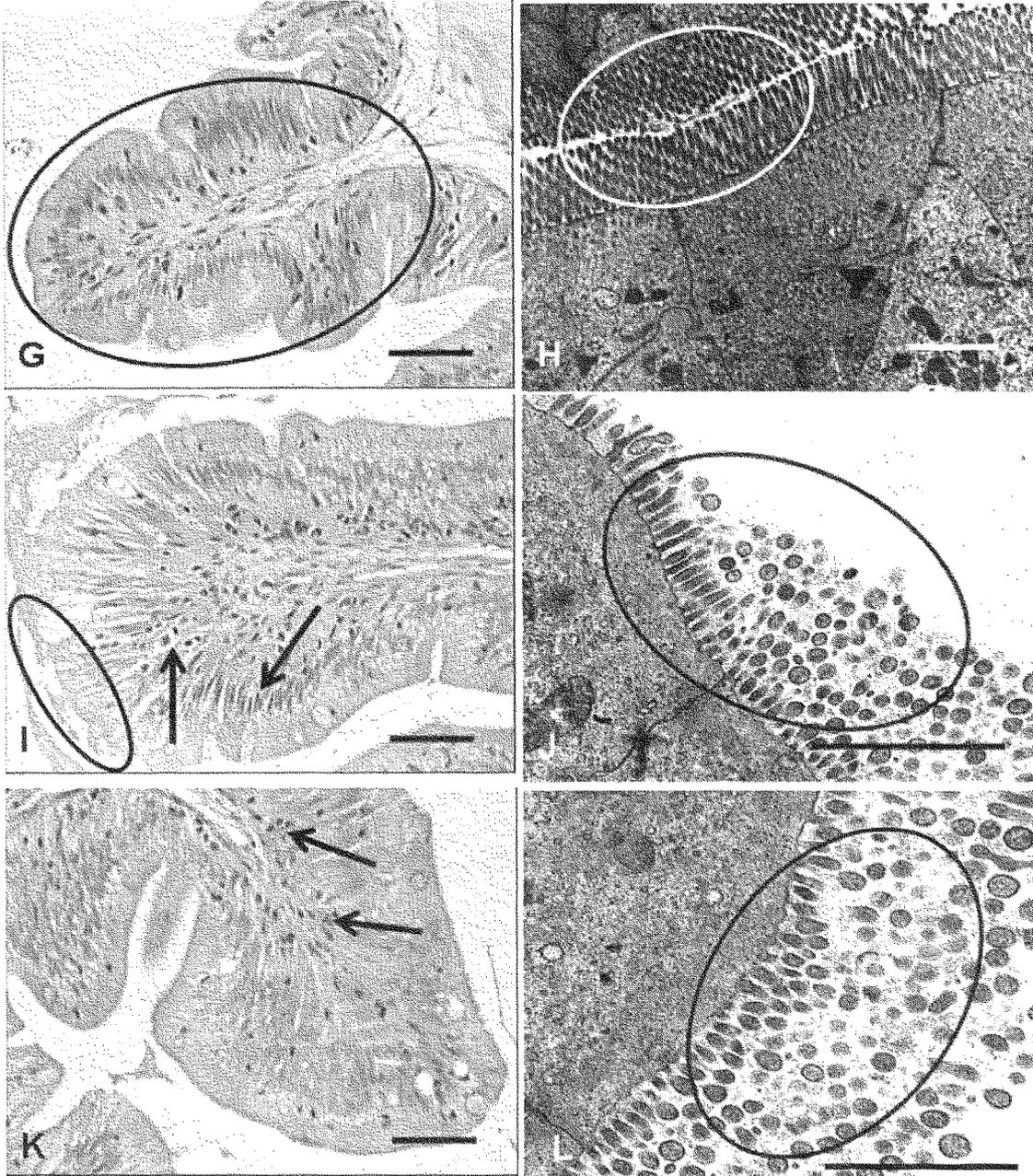


FIG. 5 (Cont.)

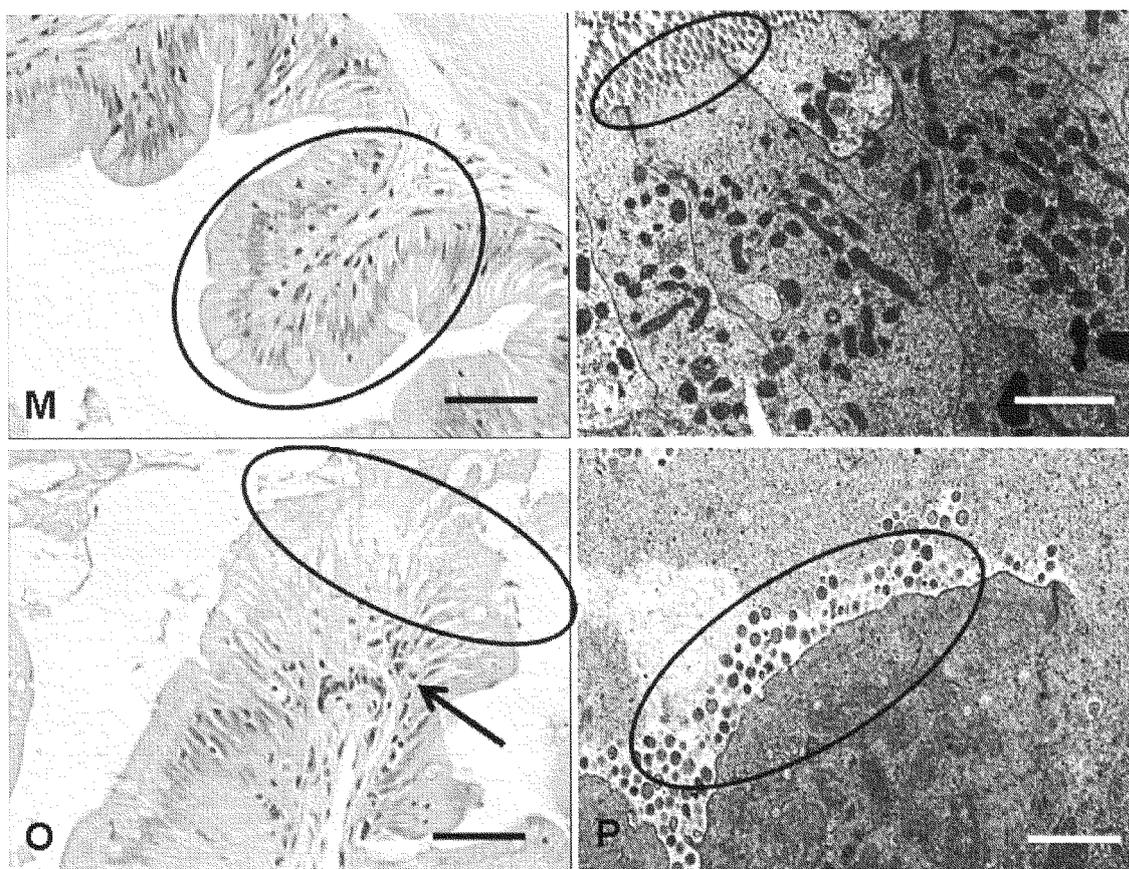


FIG. 5 (Cont.)

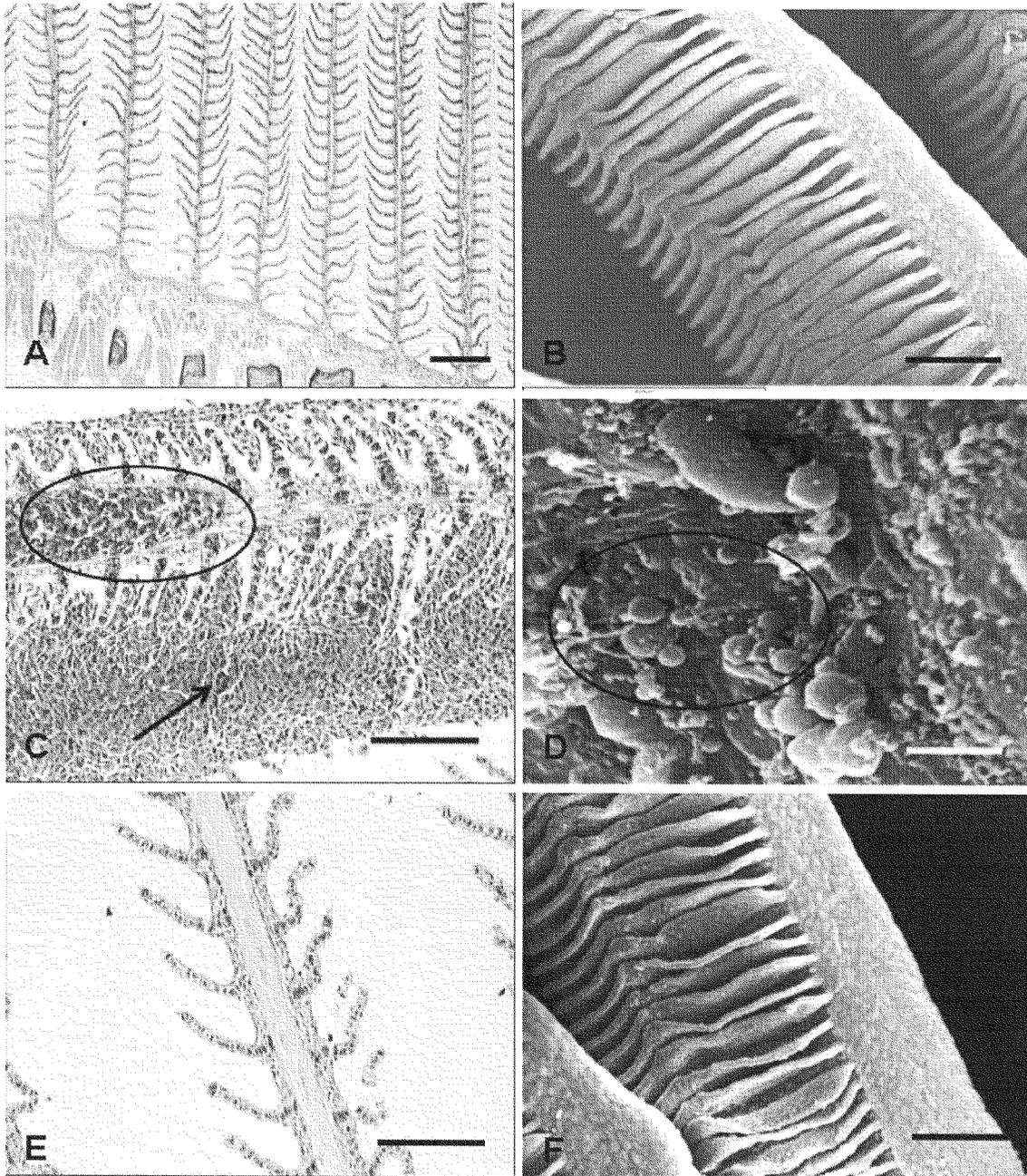


FIG. 6

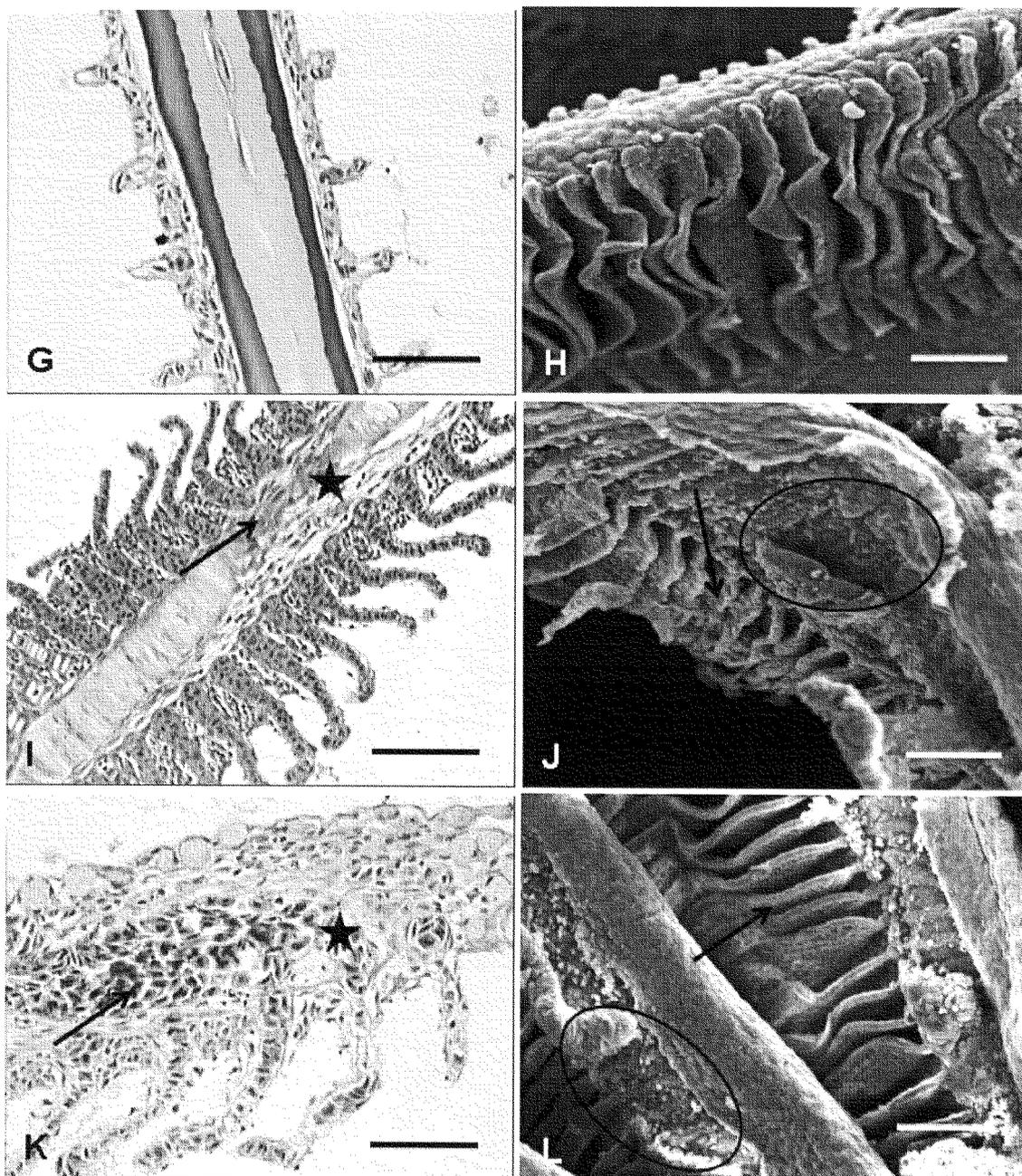


FIG. 6 (Cont.)

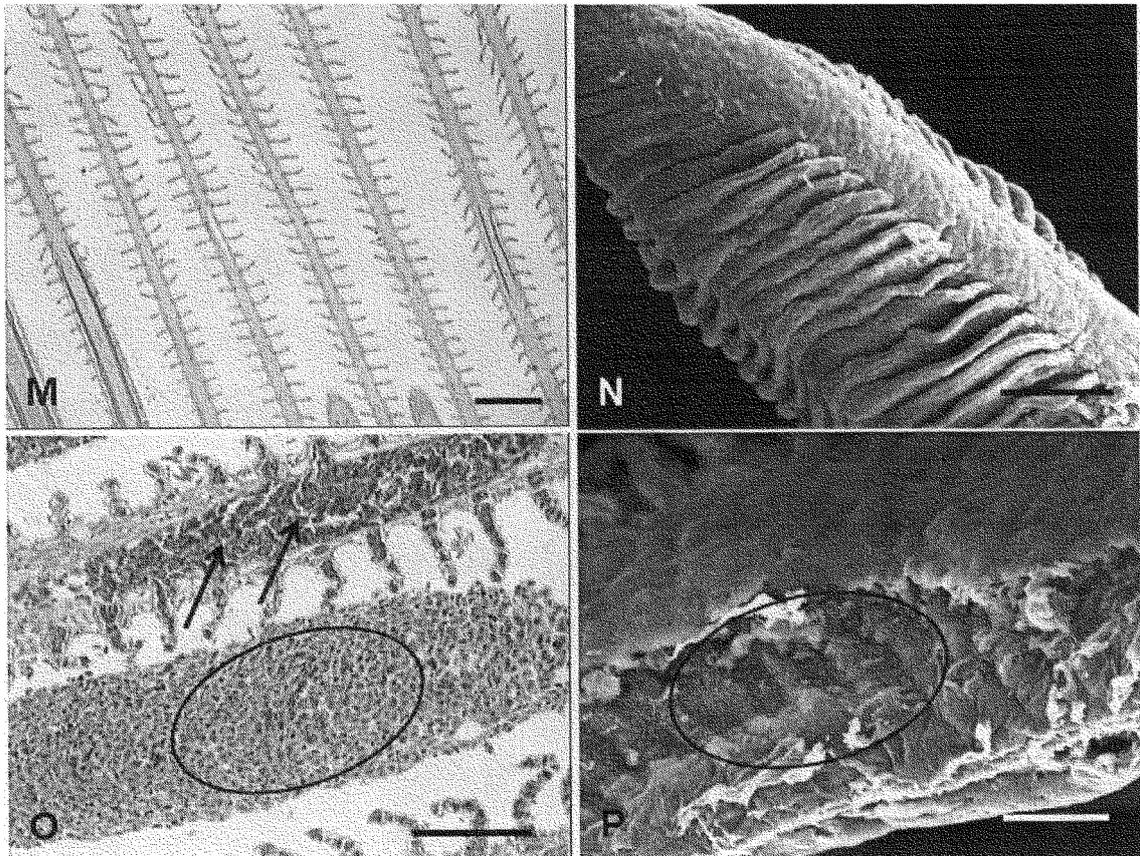


FIG. 6 (Cont.)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 340 012

② Nº de solicitud: 200803360

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
X	ES 2249167 B1 (C.S.I.C.) 16.03.2006, reivindicaciones 1,3,8,9; página 4, líneas 4-8.	1-13
X	SEVGILER et al. Effects of N-acetyl-cysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed Cyprinus carpio. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2007, vol. 87, páginas 248-254.	1-13
X	BHATTACHARYA, A y BHATTACHARYA, S. Induction of oxidative stress by arsenic in Clarias batrachus; involvement of peroxisomes. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2007, vol. 66, páginas 178-187.	1-13
A	DING, W-X. et al. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutation alteration in hepatocytes. Environmental Health Perspectives, 2000, vol. 108 (7), páginas 605-609.	1-13
A	WANG, L. et al. Structural and functional characterization of microcystin detoxification-related liver genes in phytoplanktivorous fish, Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Comparative Biochemistry and Physiology, part C, 2006, vol. 144, páginas 216-227.	1-13

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

25.03.2010

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/198 (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

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 200803360

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-13	SÍ
	Reivindicaciones	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	ES 2249167	16-03-2006
D02	WANG et al.	2006
D03	DING W. et al	2000
D04	SEVGILER, ET AL.	2007
D05	BHATTACHARYA, A. y BHATTACHARYA, S.	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 de la N-acetilcisteína (NAC) para la elaboración de medicamentos útiles para el tratamiento y prevención 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 NAC en dichos medicamento.

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

El documento D1 describe el uso de un aditivo para piensos de peces que contiene N-acetilcisteína para aumentar la tolerancia al estrés oxidativo y aumentar la detoxificación celular de contaminantes en general (reivindicaciones 8 y 9) y de los plaguicidas, en concreto. La incorporación en el pienso de NAC (en una 0,5 a 5 g por Kg de pez) estimula la síntesis intracelular de glutatión e induce la actividad de la glutatión S-transferasa. El incremento de esta actividad junto a niveles más altos de GSH permite detoxificar gran variedad de contaminantes (página 4, líneas 4-10). Para un experto en la materia, que buscara un medicamento para tratar o prevenir los efectos tóxicos que las microcistinas producen en los peces, sería evidente probar la NAC, que ya ha sido utilizado en peces para la detoxificación, de otros tóxicos, con razonables expectativas de éxito y, por lo tanto, sin ejercer actividad inventiva.

Por consiguiente, se considera que el documento D1 afecta a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1, 2, 5-12 de la solicitud.

El resto de las reivindicaciones dependientes (3, 4,13) no aportan ninguna característica técnica que, en combinación con la reivindicación de la que dependen, le otorguen actividad inventiva, ya que se derivan de forma evidente del estado de la técnica.

En las reivindicaciones 3 y 4 se concreta el uso de NAC para prevenir, tratar o recuperar las alteraciones histopatológicas que produce la intoxicación con microcistinas. La inclusión de NAC en la dieta, según el documento D1, hace aumentar el glutatión y estimula la producción de la enzima glutatión transferasa. Esta enzima se ha demostrado que interviene en la fase 2 de la detoxificación de organismos acuáticos intoxicados con microcistinas, formando éstas un compuesto conjugado con el glutatión (ver documento D2). Además, el documento D3 pone de manifiesto que los niveles de glutatión son importantes para mantener las estructuras del citoesqueleto, y que el pretratamiento con NAC evita las alteraciones que el contacto con microcistinas produce en el citoesqueleto de hepatocitos de rata. Por tanto, ya sea por uno u otro mecanismo de acción, es de esperar, que el tratamiento con una cantidad efectiva de NAC, elimine o amortigüe cualquier efecto o consecuencia que se derive del la intoxicación con microcistinas, incluidas las alteraciones histológicas.

En los documentos D4 y D5 se pone en evidencia que la NAC inyectada en determinadas dosis protege a los peces del estrés oxidativo que producen tóxicos de diferente origen (pesticidas organofosforados, arsénico). Se considera que para un experto en la materia que buscara un medicamento para tratar o prevenir los efectos tóxicos que conllevan las microcistinas, entre los que destaca el estrés oxidativo (según menciona la propia solicitud y otros muchos documentos del estado de la técnica), sería obvio probar la NAC, que ya se ha mostrado útil en combatir el mismo problema causado por otros tóxicos que también producen estrés oxidativo. Por tanto, se considera que cada uno de estos documentos por separado, afecta a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-13.