(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 402 477**

(21) Número de solicitud: 201101162

(51) Int. CI.:

***A61K 31/198*** (2006.01)
***A23K 1/18*** (2006.01)
***A23K 1/16*** (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

**20.10.2011**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**06.05.2013**

(71) Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)**
**OTRI-PABELLÓN DE BRASIL, PASEO DE LAS DELICIAS S/N**
**41012 SEVILLA ES y**
**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**CAMEÁN FERNÁNDEZ, Ana María;**
**GUTIÉRREZ PRAENA, Daniel;**
**JOS GALLEGO, Ángeles Mencía;**
**PICHARDO SÁNCHEZ, Silvia;**
**MORENO NAVARRO, Isabel;**
**PRIETO ORTEGA, Ana Isabel;**
**PUERTO RODRÍGUEZ, María;**
**GUZMÁN GUILLÉN, Remedios;**
**MOYANO SALVAGO, Mª Rosario y**
**BLANCO RODRÍGUEZ, Alfonso**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ CARVAJAL, Ramón**

(54) Título: **USO DE N-ACETILCISTEÍNA PARA PROTEGER A LOS PECES DE LA INTOXICACIÓN POR CILINDROSPERMOPSINA.**

(57) Resumen:

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 Cilindrospermopsina (CYN). 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 2 402 477 A1

## DESCRIPCIÓN

### Uso de N-acetilcisteína para proteger a los peces de la intoxicación por Cilindrospermopsina

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 Cilindrospermopsina (CYN). 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.

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

La NAC, derivado acetilado del aminoácido L-cisteína, es un conocido antioxidante que contiene grupos tiol.

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 Glutatión 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).

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 (ES2249167 A1). En el campo de las cianotoxinas, su uso queda restringido a su actividad protectora frente al estrés oxidativo y la reversión de las lesiones histopatológicas inducidas por microcistinas (MCs) en peces (WO2010061018 -A1, Caméan Fernández A, et al., 2010)

Por otro lado, la CYN es una toxina producida por cianobacterias tóxicas presentes en aguas superficiales, pertenecientes al menos a seis géneros, siendo las especies identificadas en los momentos actuales *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Anabaena bergii, Aphanizomenon ovalisporun, Aphanizomenon flos-aquae, Umezakia natans, y Raphidiopsis curvata,* entre otras. CYN se aisló por primer vez de un cultivo de *Cylindrospermopsis raciborskii*, obtenido de los reservorios de agua de bebida que surtían a la población de Palm Island, Queensland, Australia (Ohtani I. *et al.,* (1992) J. Am. Chem. Soc. 144:7941-7942), Se ha comprobado su acumulación en peces y crustáceos, afectando a la calidad y seguridad de este tipo de alimentos y suponiendo un riesgo potencial para el consumidor. En comparación con los mamíferos, los estudios sobre efectos tóxicos de CYN en peces son muy escasos, destacando que puede afectar no sólo al hígado sino también al riñón, corazón, branquias, y tracto gastrointestinal. Las cianobacterias constituyen parte de la dieta de diversos ciprinídos y cíclidos, como es el caso, por ejemplo, de las Tilapias (*Orechromis, 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.

Como mecanismo de acción tóxica más aceptado, la CYN está considerada un citotoxina general que bloquea la síntesis de proteínas en células eucariotas de mamíferos y plantas (Terao K., *et al*,, (1994) Toxicon 32:833-843; Runnegar M.T. *et al.* (1995) Biochem. Pharmacol. 49:219–225) y disminuye los contenidos de Glutation (GSH). La disminución de GSH no parece conllevar a un incremento del estrés oxidativo en la célula, sugiriéndose que no es un mecanismo primario de la toxicidad de CYN. Sin embargo, recientemente, se ha comprobado la participación directa del estrés oxidativo en la patogénesis de CYN en peces (Gutierrez-Praena D. *et al.* (2011) Aquat. Tox. 105:100-106; Puerto M. *et al.*, (2011) Ecotoxicology, aceptado, en prensa), detectándose un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lipoperoxidación (LPO) y oxidación de

proteínas, así como cambios en la actividad de diversas enzimas antioxidantes en peces. Los escasos estudios toxicológicos realizados hasta la actualidad han conducido al establecimiento de una Ingesta Diaria Tolerable (IDT) provisional de 0,03 µg/Kg/día de CYN, y la propuesta de un valor guía provisional de 1 µg/L de CYN en aguas de bebida.

Actualmente no existe un tratamiento antidótico específico en casos de intoxicación por CYN y sus epímeros procedentes de cianobacterias. Hasta la fecha no se conoce ningún tratamiento capaz de recuperar a los humanos, mamíferos y peces intoxicados con CYN. Teniendo en cuenta la ubicuidad de esta toxina, 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.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

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 CYN.

En tilapias (*Oreochromis sp.*) expuestas a dosis únicas y repetidas de CYN 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 Glutatión (GSH), aumento de los niveles de lipoperoxidación (LPO), de oxidación de proteínas y del ADN, en diferentes órganos (hígado, riñón), y múltiples alteraciones histopatológicas en órganos diversos como hígado, riñón, corazón, tracto gastrointestinal y branquias.

La NAC administrada en esta invención se muestra efectiva manteniendo el estado de salud del pez, previniendo daños causados por la toxina y/o mejorando los efectos tóxicos inducidos por CYN en diversos órganos de tilapias intoxicadas.

Además, el uso de NAC como aditivo alimentario no sólo mejora los niveles de GSH en hígado y riñón, sino que por su propia actividad antioxidante es

capaz de disminuir la lipoperoxidación (LPO) (hígado, riñón), la oxidación de proteínas en riñón inducida por CYN, y recuperar las lesiones histopatológicas inducidas en múltiples órganos como hígado, riñón, corazón, tracto gastrointestinal y branquias.

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 CYN.

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

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 CYN.

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.

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 CYN. El término "prevención" tal como se entiende en la presente invención consiste en evitar la aparición de

efectos tóxicos en peces expuestos a CYN. En este caso, previamente a la intoxicación por CYN, 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 CYN.

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 CYN, 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.

La CYN es una toxina de naturaleza alcaloide, en cuya estructura interviene un grupo tricíclico guanidinio unido a hidroximetiluracilo. Es producida por al menos seis géneros de cianobacterias, que se encuentran ampliamente distribuida en aguas tropicales y subtropicales. Pueden existir dos posibles epímeros de forma natural, cilindrospermopsina (CYN) y 7-epicilindrospermopsina, ambos tóxicos; la completa pérdida del grupo uracilo elimina la toxicidad de CYN. En reservas naturales de agua se ha descrito otra variante, la 7-desoxicilindrospermopsina, cuya toxicidad apenas está establecida, siendo menos tóxica en ratón que CYN.

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 CYN. El término "recuperación" hace referencia a la desaparición de los efectos tóxicos causados por la intoxicación con CYN. 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.

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 del análisis a nivel microscópico de las estructuras patológicas de las diferentes muestras obtenidas, sin excluir otras técnicas de detección.

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, la CYN puede acumularse en el tejido hepático y también puede llegar a otros órganos utilizando la sangre como medio de dispersión, de esta forma, la toxina puede 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 400 y 880 mg por Kg de peso (equivalentes a 22 y 45mgNAC/Kg/día).

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 10 µg CYN/L agua por día durante 14 días (intoxicación subcrónica). Preferiblemente los peces están expuestos a más de 200 µg CYN/ kg de 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. 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 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.

**DESCRIPCION 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 a 200 µg CYN/kg pez.**

Medidas de LPO en hígado y 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 de malonildialdehído (MDA)/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) comparación de los grupos tratados con CYN y NAC con respecto a sus respectivos grupos control y (b) comparación del grupo tratado con CYN y NAC (22 ó 45 mg NAC/pez/día) con el grupo no tratado con NAC.

**FIG. 2. Muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de NAC sobre la oxidación de proteínas en riñón de tilapias expuestas a 200 µg CYN/kg pez**

Medidas de oxidación de proteínas (grupos carbonilos; mg proteína).

Donde: el eje Y representa los valores de grupos carbonilos/mg proteína cuantificados como medida de la oxidación de proteínas expresados como media ± 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) comparación de los grupos tratados

con CYN y NAC con respecto a sus respectivos grupos control y (b) comparación del grupo tratado con CYN y NAC (22 ó 45 mg NAC/pez/día) con el grupo no tratado con NAC.

**FIG 3. Muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de NAC sobre el cociente GSH/GSSG en hígado de tilapias expuestas a 200 µg CYN/kg pez**

Medidas del cociente Glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG)
Donde: el eje Y representa los valores de GSH/GSSG (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) comparación de los grupos tratados con CYN y NAC con respecto a sus respectivos grupos control, (b) comparación del grupo tratado con CYN y NAC (22 ó 45 mg NAC/pez/día) con el grupo no tratado con NAC, y (c) comparación del grupo tratado con CYN y 22 mg NAC/pez día NAC, con el grupo tratado con CYN y 45 mg NAC/pez/día.

**FIG. 4. Muestra los cambios histopatológicos en hígado de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por NAC**.

A, C, E, G, I : Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 10 µm. B, D, F, H, J: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10 µm.

**FIG. 5. Cambios histopatológicos en riñón de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por NAC.**

A, C, E, G, I: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 10 µm. B, D, F, H, J: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10 µm.

**FIG. 6. Cambios histopatológicos en corazón de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por NAC**

A, C, E, G, I: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 10 µm. B, D, F, H, J: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10 µm.

**FIG. 7. Cambios histopatológicos en intestino de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por NAC**

A, C, E, G: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 10 µm. B, D, F, H: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10 µm.

**FIG. 8: Cambios histopatológicos en branquias de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por NAC observados con el microscopio óptico.**

A, B, C, D: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 10 µm.

**FIG. 9: Cambios histopatológicos en branquias de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por NAC observados por microscopía electrónica.**

A, C, E: Observaciones ultraestructurales al microscopio electrónico de barrido (SEM: scanning electron microscope). Las barras miden 10 µm. B, D, F: Observaciones ultraestructurales al microscopio electrónico de transmisión (TEM: transmisión electron microscope). Las barras miden 10 µm.

## MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCIÓN

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 CYN.

### Ejemplo 1

La invención se llevó a cabo empleando un total de 48 peces macho de *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia), de peso medio 55,2 ± 6,77 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 utilizaron 6 grupos experimentales con 8 animales en cada uno. Los peces fueron intoxicados con la toxina CYN pura (pureza > 95%, Alexis Corporation, Lausen, Suiza) por vía oral (sonda nasogástrica). La administración de NAC se realizó a través del pienso, empleando dos niveles de dosis, 22 y 45 mg NAC/pez/día (equivalentes a 400 y 800 mg NAC/pez/día). 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 CYN en la dieta (dosis única de 200 µg/ kg pez).
Acuarios 3 y 5: Peces alimentados con pienso + NAC (22 y 45 mg de NAC/pez, respectivamente) durante 7 días.
Acuarios 4 y 6: Peces con pienso + NAC (22 y 45 mg de NAC/pez, respectivamente) durante 7 días. Los peces se intoxicaron con una dosis única de 200 µg CYN/kg 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 Gutiérrez-Praena et al., 2011 (Aquat. Toxicol. 105: 100-106). Concretamente la medida de la lipoperoxidación lipídica (LPO) se realizó midiendo el malonildialdehído o sustancias de degradación de la peroxidación de los lípidos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico; la oxidación de proteínas mediante la determinación de los grupos carbonilo, y se determinó además el cociente glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en hígado y riñón. Los estudios histológicos por microscopia óptica y electrónica en los distintos órganos se llevaron a cabo según Atencio et al (2008, Toxicol Pathol 36:449-458), incluyendo en el caso de las branquias microscopia electrónica de barrido (SEM) y microscopia electrónica de transmisión (TEM).

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 cómo la toxina CYN incrementa la lipoperoxidación (LPO) en hígado (1,5 veces), y en riñón (1,2 veces) frente al control, y los efectos protectores de NAC se demuestran con las dos dosis ensayadas.

2) En la FIG. 2 se observa cómo CYN aumenta la oxidación de proteínas en riñon (1,5 veces) con respecto al control, y los efectos protectores parciales de la dosis mas baja de NAC (22 mg NAC/pez/dia) y totales de la dosis más elevada de 45 mg NAC/pez/día.

3) La FIG. 3 muestra la disminución de los cocientes GSH/GSSG en hígado de los peces intoxicados, y la aplicación de NAC mejoró este parámetro.

**Ejemplo 2. NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en hígado.**

El estudio histopatológico del hígado de los peces pertenecientes al lote tratado con CYN puso de evidencia un proceso degenerativo que consistió en una desorganización de los hepatocitos y presencia de vesículas de grasa en el citoplasma (FIG. 4C), frente a una ausencia de lesiones del grupo control (FIG. 4A), caracterizada por cordones hepáticos normales, con hepatocitos con una morfología poliédrica normal. Al microscopio electrónico se observa que las células muestran el citoplasma repleto de grasa (FIG. 4D).

En los dos lotes de peces tratados exclusivamente con NAC se observó que, con ambas dosis (22 y 45 mg NAC/pez/dia) no existían lesiones hepáticas (FIG. 4 E, F). En los lotes de peces a los que junto a la toxina CYN se les administró 22 mg NAC/kg pez/día las lesiones inducidas por CYN prácticamente no se presentan, observándose en los hepatocitos cierta actividad metabólica, con contenido de glucógeno sin llegar a ser patológico (FIG 4G). Al microscopio electrónico se observa el detalle de un hepatocito con cierto contenido de glucógeno en el citoplasma (FIG. 4H).

El estudio de los peces del lote a los que junto con CYN se les administró una dosis de 45 mg NAC pez/día mostró una recuperación total de las lesiones provocadas por la toxina, tanto al microscopio óptico, como al electrónico (FIG. 4 I, J).

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 y mitocondrias.

C, D: Tilapias expuestas sólo a CYN (200 µg/kg pez/día C. Parénquima hepático desorganizado, hepatocitos con presencia de vesículas de grasa (cículo). D. El hepatocito presenta un núcleo denso normal rodeado de un escaso citoplasma repleto de grasa (círculo).

E, F: Tilapias expuestas solo a NAC (dosis alta, 45 mg NAC/pez/día). E. Parénquima hepático con los hepatocitos dispuestos en cordones y zona pancreática aparentemente normal. F. Detalle de hepatocito aparentemente normal, con organoides citoplasmáticos y ausencia de grasa y glucógeno granular.

G, H: Hígado de tilapias tratadas con CYN+NAC (22 mg NAC/pez/día). G. Hepatocitos en cordones con morfología aparentemente normal, morfología poliédrica con núcleo central y citoplasma claro con cierto contenido en glucógeno (círculo) H. Detalle de hepatocito con cierto contenido de glucógeno (círculo).

I, J: Hígado de peces tratados con CYN+NAC (45 mg NAC/pez/día). I. Parénquima con hepatocitos en cordones aparentemente normal. L. Detalle de hepatocito normal

**Ejemplo 3. NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en riñón.**

Morfológicamente los riñones de los peces del lote tratados con CYN mostraron una glomerulopatía, observándose al microscopio óptico una atrofia glomerular y dilatación de la capsula de Bowman (FIG. 5C), y al microscopio electrónico, engrosamiento y densificación de las membranas basales y colapso de los capilares fenestrados (FIG. 5D). Los riñones de los peces del lote control presentaron una estructura aparentemente normal (FIG. 5 A, B).

El estudio de los peces de los lotes tratados solamente con las dosis de NAC (22 y 45 mg NAC/pez/día) no mostró ninguna lesión renal (FIG. 5 E, F).

En los peces a los que se les administró CYN junto con 45 mg NAC/pez/día se observó estructuralmente y ultraestructuralmente una morfología del parénquima renal totalmente normal (FIG. 5 G, H).

A, B: Riñón de los peces control.
C, D: Histología de peces tratados con CYN. C. Detalle de parénquima renal con glomérulos atróficos (círculo) y dilatación de la capsula de Bowman (estrella). D. Microvellosidades de los túbulos contorneados proximales tumefactos y pérdida de dichas microvellosidades (flecha).
E, F: Tilapias expuestas sólo a NAC (45 mg NAC/pez/día). E. Parénquima renal con glomérulo renal aparentemente normal. F. Detalle del túbulo contorneado proximal aparentemente normal.
G, H: Histología del riñón de peces tratados con CYN+ NAC (45 mg NAC/pez/día) G. Glomérulos y túbulos con apariencia normal. H Membrana basal aparentemente normal.

**Ejemplo 4. NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en corazón.**

El estudio histopatológico realizado sobre peces tratados con CYN mostraron estructuralmente a nivel de corazón un proceso de miofibrolisis, con pérdida de miofibrillas, presencia de edemas y hemorragias. Ultraestructuralmente se apreció claramente esta miofibrolisis de la fibra cardiaca, caracterizada por una pérdida de las miofibrillas (FIG. 6 C, D). El corazón de los peces del lote control presentó una estructura aparentemente normal (FIG. 6 A, B).

Los peces tratados solo con NAC (22 y 45 mg NAC/pez/dia) presentan una morfología de las fibras cardiacas similares a las del grupo control (FIG. 6 E, F).
Los procesos degenerativos en corazón que se observaron en los peces tratados con CYN fueron mucho más leves en aquellos peces tratados con suplemento de NAC a la dosis más baja (22 mg NAC/pez/dia), observándose cierta pérdida de miofibrillas y ligeras hemorragias aisladas, de escaso interés (FIG. 6 G, H). No se observaron lesiones en los tratados con la dosis más elevada (45 mg NAC/pez/día) (FIG. 6 I, J).

A, B: Corazón de peces control.

C, D: Histología del corazón de peces tratados con CYN. C. Miofibrolisis, pérdida de miofibrillas (círculo), ciertos edemas (estrella). D. Pérdida y desintegración de las miofibrillas (círculo).

E, F: Corazón de peces tratados con NAC (dosis 45 mg NAC/pez/día) E. Detalle de corazón con fibras musculares aparentemente normal. F. Estructura de las miofibrillas prácticamente normal.

G, H: Histología del corazón de peces tratados con CYN+NAC (22 mg NAC/pez/día) G. Detalle de miocardio con fibras musculares aparentemente normales pero con ciertas hemorragias (círculo). H. Detalle de miofibrillas con escasa pérdida de material contráctil (círculo).

I, J: Histología del corazón de peces tratados con CYN+NAC (45 mg NAC/pez/dia) I. Detalle de corazón con fibras musculares aparentemente normal. J. Detalle de miofibrillas aparentemente normal.

**Ejemplo 5. NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en intestino.**

A nivel de intestino en los peces tratados con CYN se observaron lesiones, frente al lote control (FIG. 7 A, B), caracterizadas por un proceso de enteritis con necrosis de enterocitos, al microscopio óptico (FIG. 7C), y al microscopio electrónico, por una pérdida de microvellosidades muy manifiesta (FIG. 7D).

Tras la administración de las dos dosis de NAC (22 y 45 mg NAC/pez/día, equivalentes a 400, 880 mg/kg) solo se observó una actividad manifiesta de las células caliciformes, sin interés patológico (FIG. 7 E, F).

Los peces a los que se les administró NAC junto con la toxina CYN mostraron una protección con ambas dosis, con una estructura aparentemente normal cuando fueron observadas tanto al microscopio óptico como electrónico (FIG. 7 G, H).

A, B: Intestino de peces control. A. Vellosidades aparentemente normales con enterocitos aparentemente normales. B. Enterocitos con abundantes microvellosidades aparentemente normales y células caliciformes.

C, D: Histología de intestino de tilapias tratadas con CYN. C. Detalle de vellosidades intestinales con enterocitos necrosados (círculo) D. Alteración de los enterocitos con pérdida parcial de las microvellosidades (círculo).

E, F: Intestino de peces tratados con NAC (dosis 45 mg NAC/pez/día) E. Vellosidades aparentemente normales y abundantes células caliciformes (flecha). F. Enterocitos con abundantes microvellosidades (círculo).
G, H: Intestino de Tilapias tratadas con CYN + NAC (45 mg NAC/pez/día) G. Detalle de vellosidades intestinales normales con enterocitos aparentemente normales y abundantes células caliciformes (flecha). J. Enterocitos con abundantes microvellosidades (circulo) y células caliciformes aparentemente normales (flecha).

**Ejemplo 6. NAC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas en branquias.**

Al microscopio óptico las branquias de los peces tratados con CYN presentaron, a nivel de las laminillas primarias y secundarias, procesos de hiperemia y pérdida de las prolongaciones lamelares (FIG. 8B). Estas lesiones no fueron observadas en el lote control, que presentó una morfología aparentemente normal (FIG. 8A).

En los lotes de peces tratados con CYN y ambas dosis de NAC se demuestra una recuperación de las lesiones provocadas (FIG. 8C).

Al microscopio electrónico de barrido (SEM) se observó una alteración de la morfología con pérdida de continuidad del arco branquial, y presencia de un infiltrado celular (FIG. 9C), y al microscopio de transmisión electrónica (TEM) se detectó una fuerte hiperemia de los capilares con presencia de células de infiltrado inflamatorio (FIG. 9D). Los peces del grupo control (FIG. 9 A, B) no presentaron anomalías.

Los peces tratados con CYN y ambas dosis de NAC (22 y 45 mg NAC/pez/dia, equivalentes a 400 y 800 mg/kg de NAC, respectivamente) mostraron recuperación de las lesiones provocadas por la toxina, presentándose filamentos branquiales y arcos branquiales aparentemente normales (FIG 9 E, F).

FIG. 8 (Microscopia óptica) A: Branquias de peces control.
B: Branquias de peces tratados con CYN. Detalle de filamento branquial con presencia de hiperemia en laminillas secundarias (circulo).

C: Branquias de peces tratados con NAC (45 mg NAC/pez/día). Detalle de filamento branquial aparentemente normal.

D: Histología de branquias de peces tratados con CYN+NAC (22 y 45 mg NAC/pez/día) . Detalle de filamento branquial aparentemente normal.

FIG. 9 A, B: peces control.

C, D: Branquias de peces tratados con CYN pura. C. Arco branquial con pérdida de continuidad, erosionado y presencia de un infiltrado celular (círculo). D. Detalle de laminilla con hiperemia de capilares (círculo).

E, F: Branquias de peces tratados con CYN+NAC (45 mg NAC/pez/día, equivalente a 800 mg NAC/kg pez). E. Filamento branquial aparentemente normal. F. Arco branquial aparentemente normal.

## REIVINDICACIONES

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 cilindrospermopsina.

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 cilindrospermopsina.

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.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la N-acetilcisteína se administra en una cantidad diaria de entre 22 y 45 mg NAC/pez/día (equivalentes a 400 y 880 mg por Kg de peso del pez, respectivamente).

6. Uso según la reivindicación 5, donde la composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral o intraperitoneal.

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.

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.

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.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde los peces pertenecen al género *Orechromis sp.*

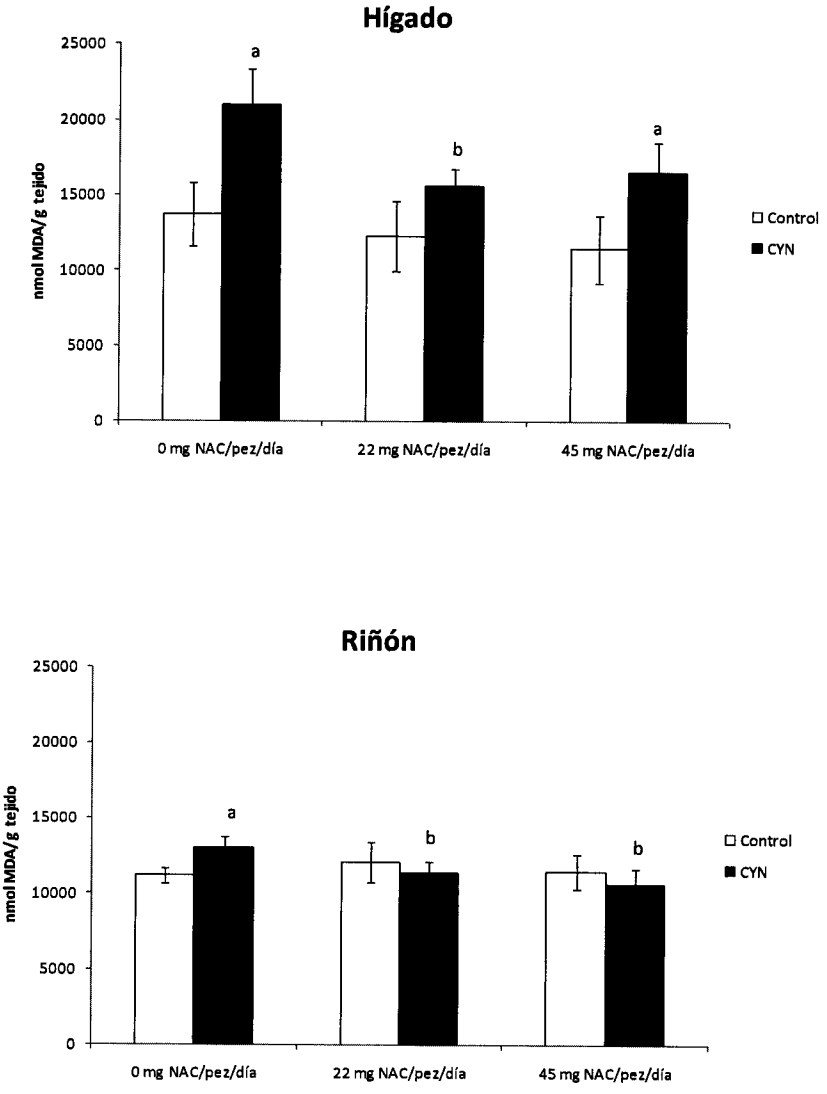
Hígado
25000
20000
15000
10000
5000
0
nmol MDA/g tejido
a
b
a
0 mg NAC/pez/día
22 mg NAC/pez/día
45 mg NAC/pez/día
Control
CYN
Riñón
25000
20000
15000
10000
5000
0
nmol MDA/g tejido
a
b
b
0 mg NAC/pez/día
22 mg NAC/pez/día
45 mg NAC/pez/día
Control
CYN

FIG. 1

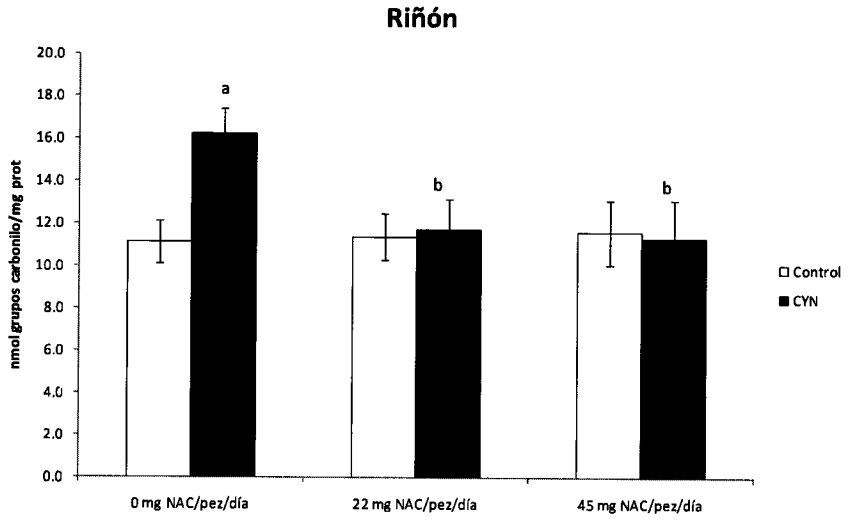
Riñón
nmol grupos carbonilo/mg prot
20.0
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
a
b
b
0 mg NAC/pez/día
22 mg NAC/pez/día
45 mg NAC/pez/día
Control
CYN

FIG. 2

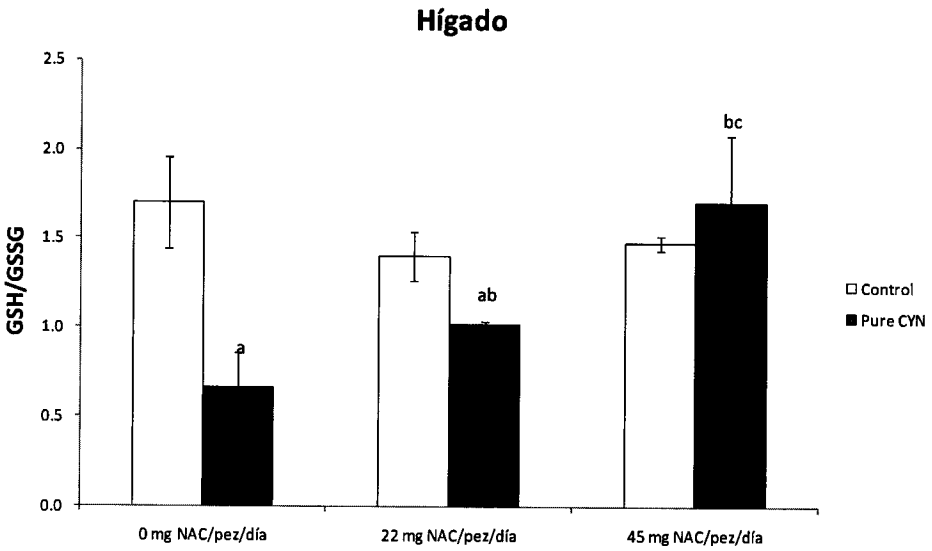
Hígado
GSH/GSSG
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
ab
bc
0 mg NAC/pez/día
22 mg NAC/pez/día
45 mg NAC/pez/día
Control
Pure CYN

FIG. 3

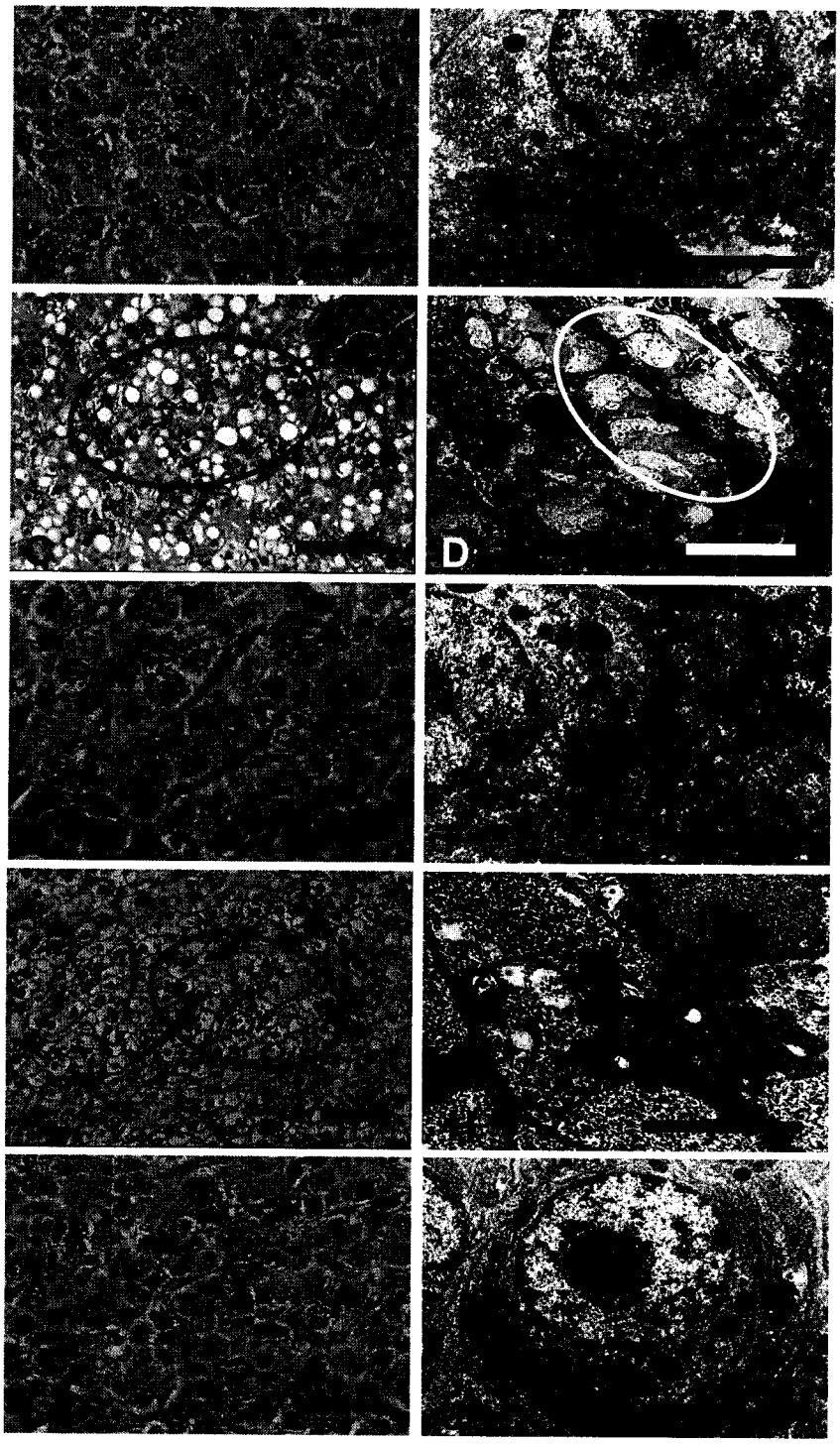


FIG. 4

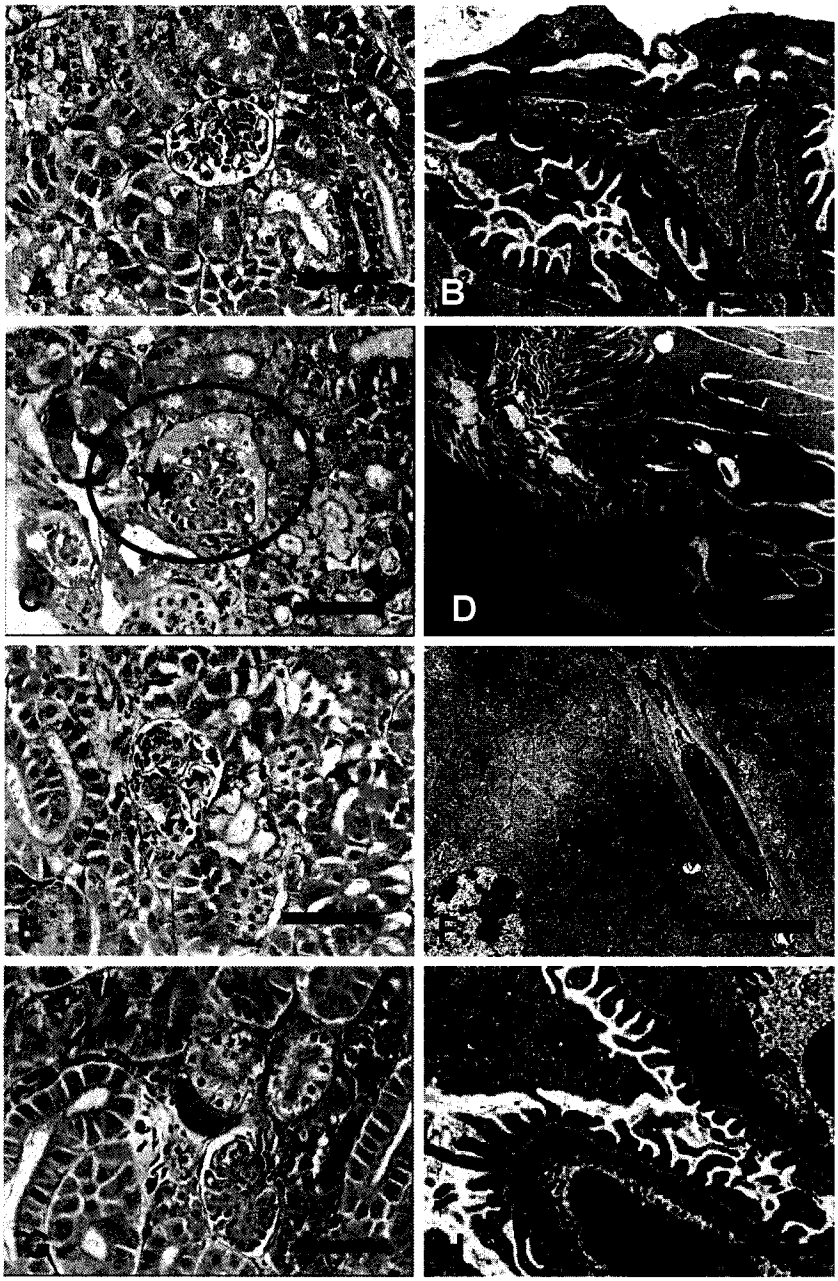


FIG. 5

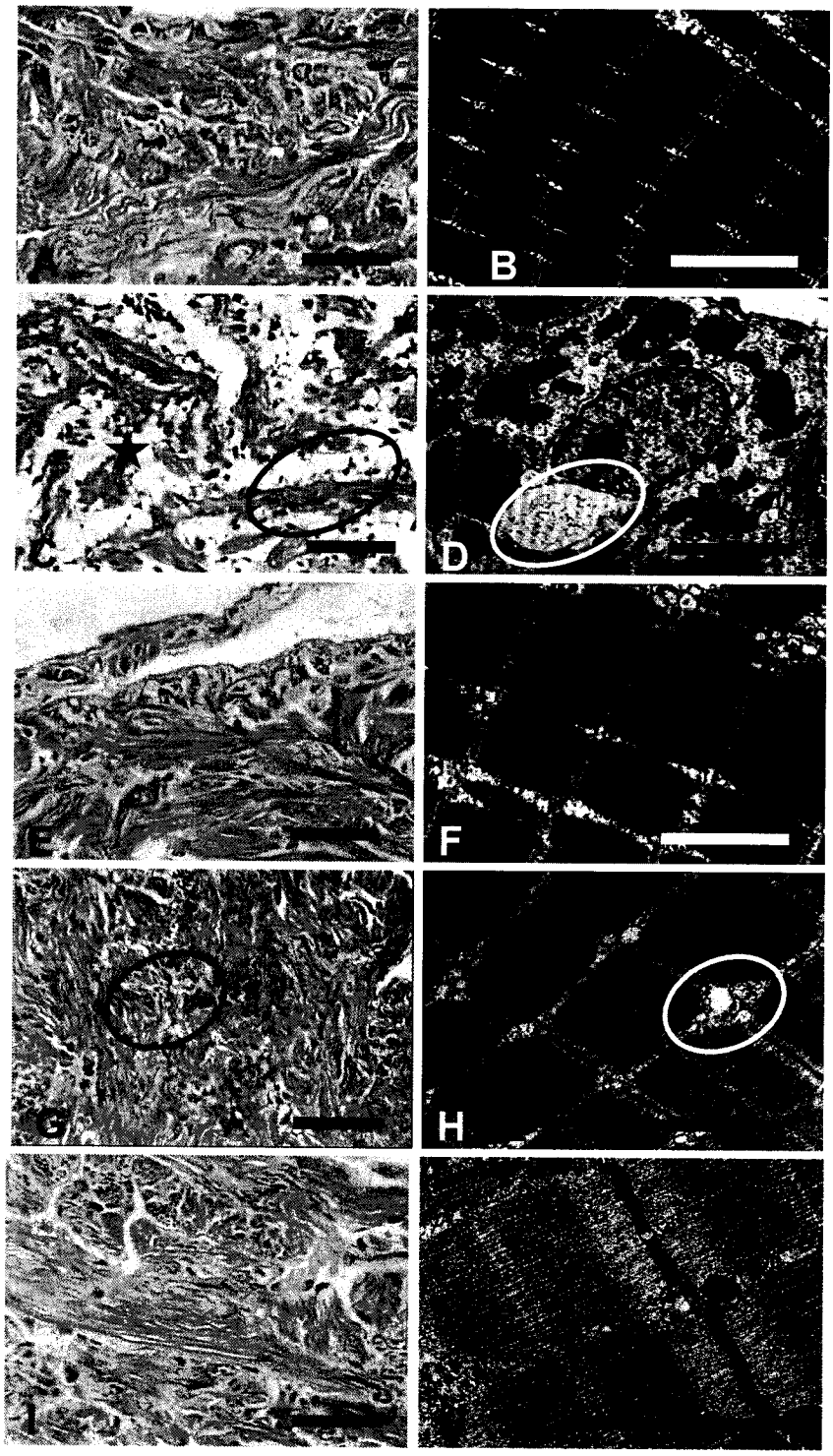


FIG. 6

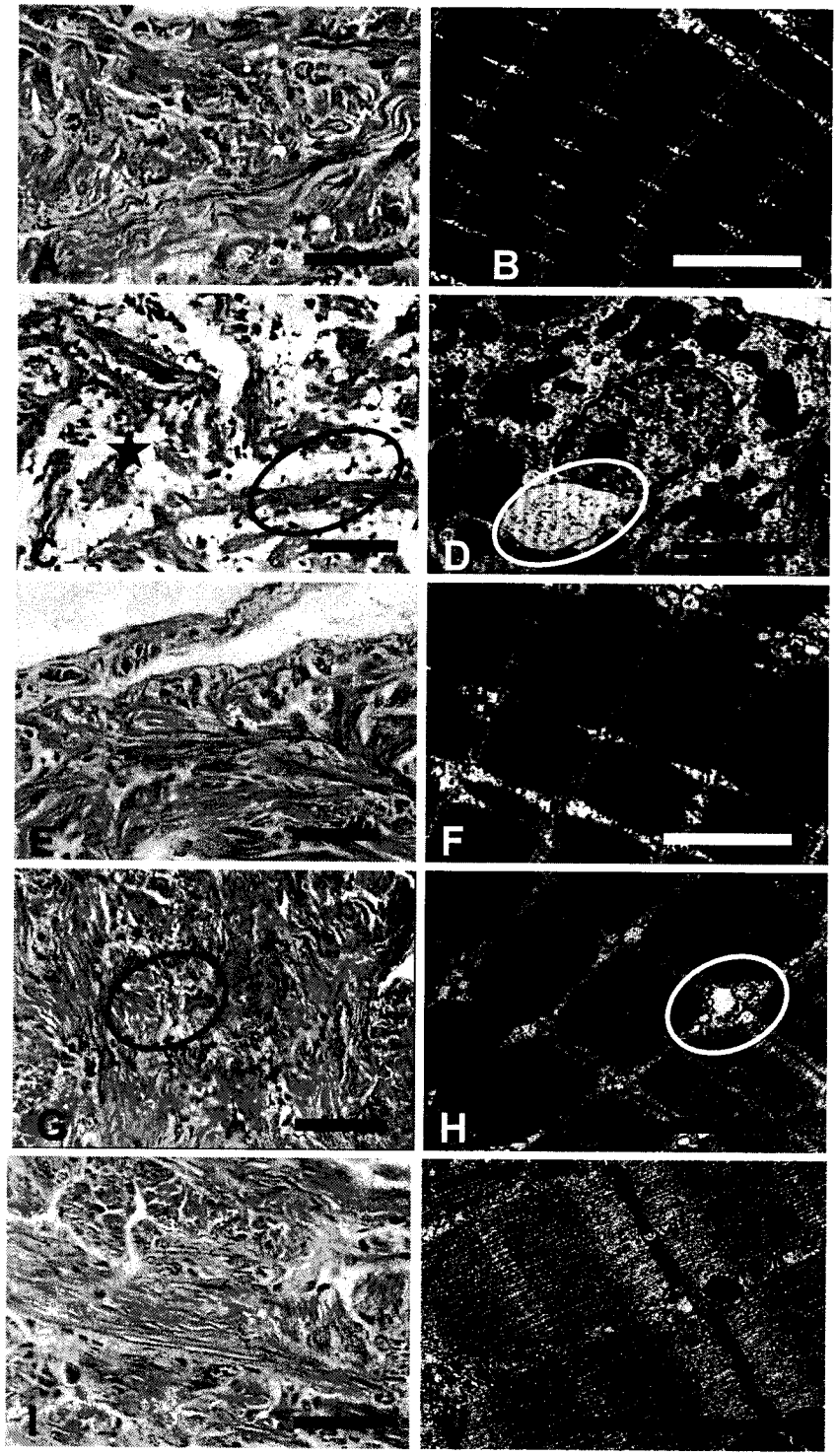


FIG. 7

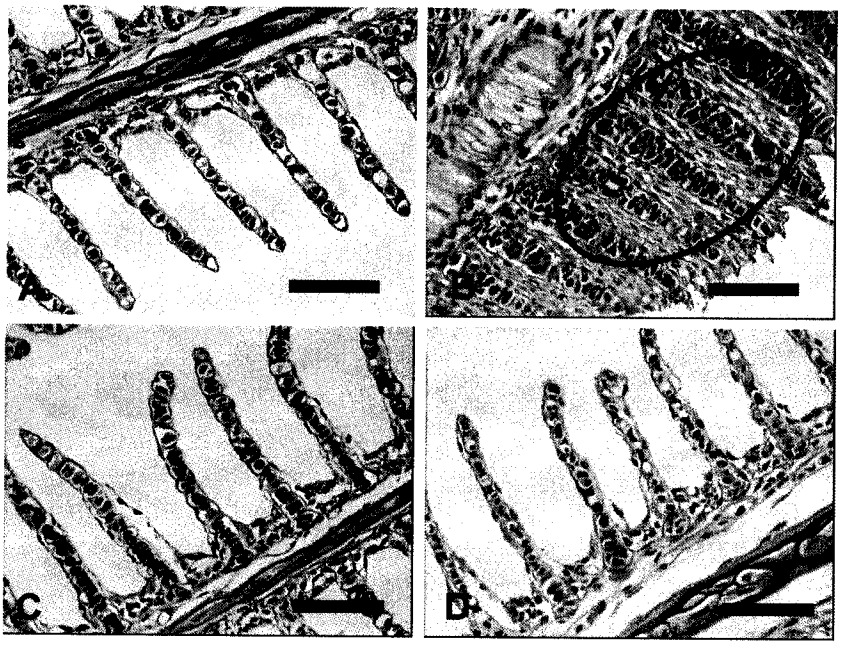


FIG. 8

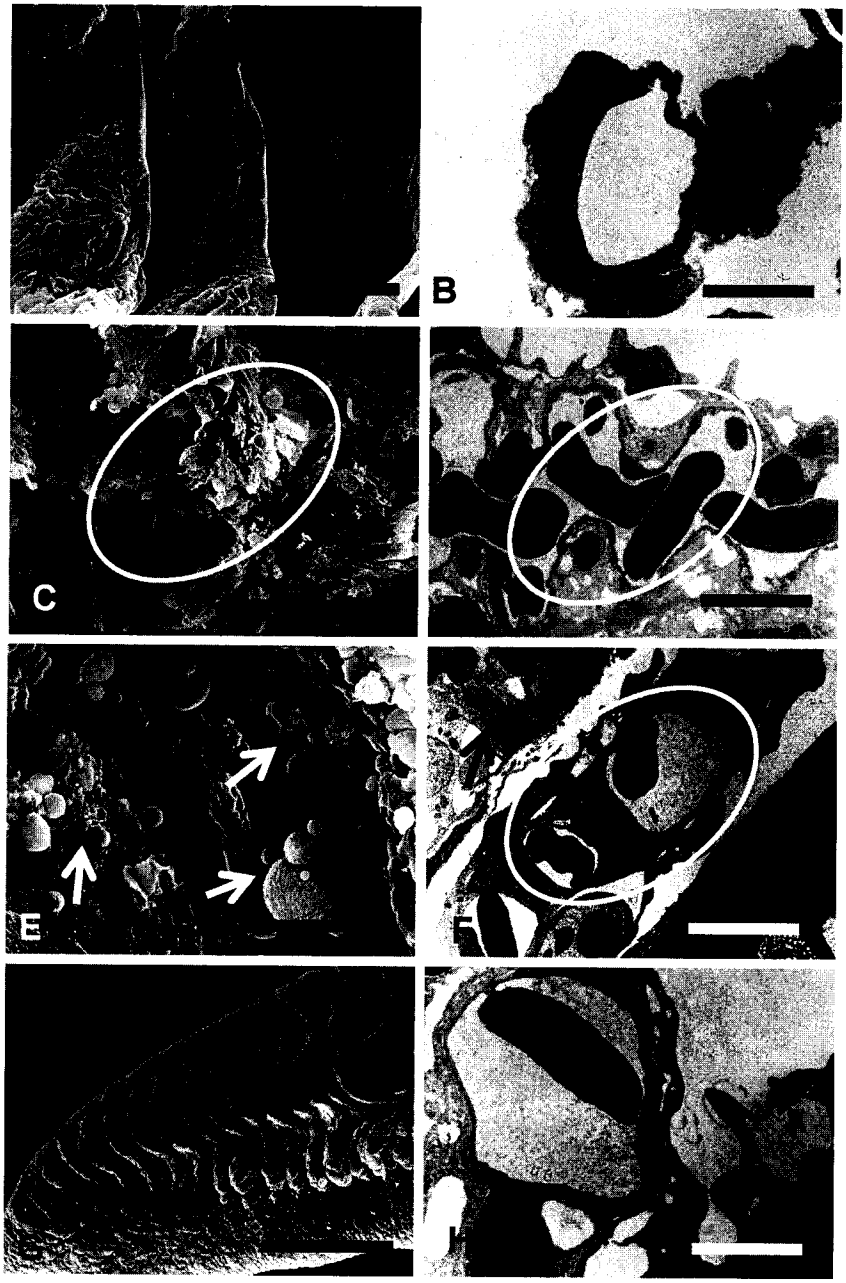


FIG. 9

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201101162

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 20.10.2011

(32) Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| **Categoría** | (56) **Documentos citados** | **Reivindicaciones afectadas** |
|---|---|---|
| A | GUTIÉRREZ- PRAENA, D, et al. Oxidative stress reponses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a single dose of pure cylindrospermopsin under laboratory conditions: influence of exposure route and time of sacrifice. Aquatic toxicology, 2011, vol. 105, páginas 100-106. | 1 |
| A | GUTIÉRREZ- PRAENA, D, et al. Alteraciones hepáticas y renales inducidas por cilindropsermopsina en tilapias. Influencia de la vía de exposición. XIX Congreso Español de Toxicología. 2011, vol. 28 (1). Resumen C68. | 1,3 |
| A | ES 2249167 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) 16.03.2006, todo el documento. | 1-13 |
| A | ES 2340012 A1 (UNIV SEVILLA) 27.05.2010, todo el documento. | 1-13 |
| A | RUNNEGAR, M. et al. Inhibition of reduced glutathione synthesis by cyanobacterial alkaloid cylindrospermospsin in cultured rat hepatocytes. Biochemical Pharmacology, 1995, vol., 49, páginas 219-225. | 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** | **Examinador** | **Página** |
|---|---|---|
| 01.10.2012 | A. I. Polo Diez | 1/4 |

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

***A61K31/198*** (2006.01)
***A23K1/18*** (2006.01)
***A23K1/16*** (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, WPI, INTERNET, BIOSIS, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 01.10.2012

**Declaración**

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)** | Reivindicaciones | 1-13 | **SI** |
| | Reivindicaciones | | **NO** |
| **Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)** | Reivindicaciones | 1-13 | **SI** |
| | Reivindicaciones | | **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 se publica.

**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 | GUTIÉRREZ-PRAENA, D. et al. | 2011 |
| D02 | GUTIÉRREZ-PRAENA, D. et al. | 2011 |
| D03 | ES 2249167 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION) | 16.03.2006 |
| D04 | ES 2340012 A1 (UNIV SEVILLA) | 27.05.2010 |
| D05 | RUNNEGAR, M. et al. | 1995 |

**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 invención se refiere, según las dos primeras reivindicaciones, al uso de una composición que comprende N-acetilcisteína (NAC) para la elaboración de un medicamento útil en la prevención, el tratamiento y la recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a cilindroespermopsina (CYN).

Las reivindicaciones dependientes caracterizan la composición y los efectos tóxicos a los que se refieren las dos primeras reivindicaciones.

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

Los documentos D1 y D2 tratan de los efectos tóxicos que producen la cilindroespemopsina en peces. Los peces intoxicados con CYN presentan síntomas de estrés oxidativo como demuestran los biomarcadores estudiados: descenso en los niveles de glutatión (GSH), aumento de oxidación lipídica y protéica, aumento en los niveles de NADPH oxidasa, etc. También se detectan alteraciones histopatológicas en el hígado y en el riñón producidas por la exposición a CYN.

En los documentos D3 y D4 se describe la utilización de composiciones que contienen NAC tanto para el tratamiento de peces que presentan estrés oxidativo como para aumentar la detoxificación celular de contaminantes como ciertos plaguicidas organofosforados y las microcistinas. La NAC es capaz de eliminar el estés oxidativo en ambos casos así como de recuperar las alteraciones histopatológicas de producidas por las microcistinas . La actuación de la NAC se realiza por diferentes caminos: por una lado funciona como antioxidante a través de su grupo tiol, pero además es un precursor de la síntesis de GSH como proveedor de cisteína y está involucrada en el ciclo del glutatión ya que activa la glutatión reductasa, responsable de la regeneración del GSH y la glutatión transferasa, involucrada en la detoxificación de gran número de contaminantes a través de la conjugación del tóxico con el GSH.

El documento D5 estudia el efecto de La CYN en hepatocitos de rata. Según este documento, el descenso de GSH que se observa en los hepatocitos tratados con CYN se debe no tanto a su utilización del GSH en los hepatocitos (en la detoxificación con glutatión transferasa o en la oxidación del GSH a GSSG) como a la inhibición en su síntesis. De hecho, el aporte de NAC, no impide la caída de GSH ni los efectos tóxicos producidos por la CYN.

Por tanto, se considera que, si bien el estrés oxidativo ha sido tratado con composiciones que contienen NAC (documentos D3 yD4) y sería, por tanto, uno de las posibles medicamentos, disponibles para tratar el estrés oxidativo producido por CYN, no sería obvio para un experto en la materia, que dichas composiciones fuesen a eliminar o a prevenir el estrés oxidativo producido por la CNY. El único documento que describe el empleo de composiciones con NAC en intoxicación de hepatocitos de rata con CYN (D5) no logra evitar los efectos tóxicos que la CYN produce.

En consecuencia, se considera que ningún documento describe ni sugiere el uso de una composición que contiene NAC para tratar ni prevenir los efectos tóxicos que producen la cilindroespermopsina (CYN) por lo que se considera que todas las reivindicaciones de la solicitud cumplen el requisito de novedad y de actividad inventiva.