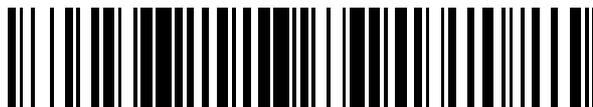


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 391**

21 Número de solicitud: 201201151

51 Int. Cl.:

A61K 31/205 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

A61P 39/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

08.11.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.05.2014

Fecha de la concesión:

29.09.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.10.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (50.0%)
OTRI-Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias
s/n
41013 Sevilla (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD DE CORDOBA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CAMEAN FERNÁNDEZ, Ana María;
VÁZQUEZ CUETO, Carmen María;
GUZMÁN GUILLÉN, Remedios;
PRIETO ORTEGA, Ana Isabel;
MORENO NAVARRO, Isabel;
JOS GALLEGO, Ángeles Mencia;
PICHARDO SÁNCHEZ, Silvia;
PUERTO RODRÍGUEZ, María;
GUTIÉRREZ PRAENA, Daniel;
MOYANO SALVAGO, M. Rosario y
BLANCO RODRÍGUEZ, Alfonso**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ CARVAJAL, Ramón

54 Título: **Uso de L-Carnitina para proteger a los peces de la intoxicación por cilindrospermopsina**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende L-Carnitina (LC) 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 2 460 391 B2

DESCRIPCIÓN

Uso de L-Carnitina para proteger a los peces de la intoxicación por Cilindrospermopsina

5 La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende L-Carnitina (LC) 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
10 se utiliza para la fabricación de un alimento funcional, un complemento vitamínico, o un complemento nutricional.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 La L-carnitina (L-3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilaminobutirato) (LC) es un derivado aminoacídico sintetizado a partir de los aminoácidos esenciales lisina y metionina con la ayuda de la vitamina C y otros compuestos secundarios producidos por el cuerpo (Harpaz S, Aquaculture 249: 3-21, 2005) que está presente en la mayoría de las especies animales y en muchos
20 microorganismos y plantas. La LC se encuentra ampliamente distribuido por todo el organismo, aunque se presenta en mayores cantidades en el corazón y en el músculo esquelético (Rebouche C. J. FASEB J. 6: 3379-3386,1992).

25 La función principal de este derivado aminoacídico consiste en actuar como cofactor en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria, donde se produce la β -oxidación de los mismos, para la obtención de energía metabólica (Bremer J. Physiol. Rev. 63: 1420-1480, 1983), desempeñando un papel crucial en el metabolismo de los ácidos grasos.

30 El 75% de la cantidad de LC requerida por el organismo proviene de la dieta. El resto se sintetiza endógenamente en el hígado y en menor cantidad en el riñón y cerebro, a partir de los aminoácidos lisina y metionina, como indicamos con anterioridad (Tanphaichitr V. y Broquist H. P. J. Biol. Chem. 248: 2176-2181, 1973).

35

Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos de acción de la LC, su uso beneficioso en algunas patologías cardiovasculares (Ferrari R *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci 033: 79-91, 2004; Kendler B.S. J. Cardiovasc. Nurs. 21: 9-16, 2006) se cree debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Savica V. *et al.*, Semin. Nephrol. 24: 464-468, 2004; Laviano A. *et al.*, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 9: 442-448, 2006).

Son múltiples los usos descritos para el uso de la LC sola o en combinación con otras sustancias. Así, distintos trabajos y patentes de investigación la describen para el tratamiento de astenias y anorexias (FR 4465), en combinación con citrato de lisina tribásico y de vitamina C; como complemento nutricional en sujetos convalecientes, personas de edad, deportistas, mujeres embarazadas o cualquier persona asténica que presente perturbaciones funcionales musculares (ES 2 043 062); alteraciones cardíacas asociada a la hipertensión arterial (P200901543); trastornos cerebrales centrales y periféricos, cardíacos, vasculopáticos, y trastornos del aprendizaje o relacionados con la edad, en combinación con el coenzima Q₁₀ (ES 2 269355 T3); prevención de disfunciones hepáticas y biliares frente a lesiones inducidas por agentes hepatotóxicos exógenos y endógenos por su intenso efecto antioxidante y su eficaz mejora de la circulación periférica y función cardíaca, en combinación con un extracto de *Silybum marianum* (ES 2 225 576 T3); prevención de la fibrosis renal (P201100709) y tratamiento de todas las formas de nefropatías mediante una composición de L-acetil carnitina y L-propionil carnitina (ES 2 254 206 T3); prevención ó tratamiento de alteraciones de órganos que realizan función metabólica intensa (hígado, riñón, sistema cardiovascular y cerebro) como hepatitis, nefropatías y lesiones cardiovasculares o cerebrales provocadas por sustancias tóxicas, en combinación con glutatión (ES 2 232 443 T3); la efectividad terapéutica de acetil L-carnitina en neuropatías periféricas (ES 2 039 262), y en el tratamiento de pacientes aquejados de metabolismo cerebral deficiente tal y como se produce en la demencia senil y pre-senil y enfermedad de Alzheimer (4.346.107), promoción de la regeneración del tejido nervioso, inhibición de la degeneración neuronal y trastornos cerebrales producidos por el envejecimiento y el uso de fármacos neurotóxicos, para mejorar el proceso de aprendizaje y memoria y para el tratamiento del coma y shock (ES 2 078 019 T3; ES 2 043 608; ES 2 207

287 T3); trastornos del aprendizaje en niños que sufren de déficit de atención/hiperactividad (ADHD), en combinación con la sal interna de acetil-L-carnitina y una huperzina (ES 2 237 591 T3). Además, por su mecanismo de acción, es útil para trastornos del metabolismo de los lípidos y formas alérgicas y para la activación de las defensas inmunes, en combinación con polisacáridos (ES 2 222 388 T3); propionil L-carnitina es útil para la prevención y/o tratamiento de trastornos debidos a un metabolismo lipídico anormal, tales como la hipercolesterolemia, aterosclerosis, hiperlipidemias y obesidad, en combinación con quitosana (ES 2 197 890 T3). Ha demostrado utilidad frente a la citotoxicidad inducida por agentes inmunosupresores, en combinación con glicina (ES 2 269 356 T3); enfermedades oculares como el glaucoma (ES 2 040 106); isovaleril L-carnitina ha probado ser útil para la prevención y curación de osteoporosis (ES 2 247 005 T3); enfermedades de la piel como ictiosis, psoriasis y dermatosis inducidas por una queratinización defectuosa como caspa, acné e hiperkeratosis palmar y plantar, en combinación con ácido glicólico (ES 2 088 655 T3); infecciones micóticas producidas por *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* y *Aspergillus* sp. (ES 2 101 998 T3) y son útiles para el tratamiento de infecciones intestinales, gastritis tipo B y úlceras duodenales humanas producidas por *Campylobacter* sp. y *Helicobacter* sp. en combinación con alcoholes alifáticos de cadena larga (ES 2 093 395 T3).

Concretamente en peces, la LC y derivados se ha empleado con diferentes propósitos: promotor del crecimiento, prestando protección frente a concentraciones tóxicas de amoníaco y xenobióticos, aliviar el estrés inducido por temperaturas extremas, aumentando la reproducción etc., que han sido revisados en la literatura científica (Harpaz S, *Aquaculture* 249: 3-21, 2005), con resultados a veces contradictorios. Se ha demostrado que L-carnitina, como aditivo alimentario, mejora el crecimiento (Becker *et al.*, *Aquaculture* 174:313-332, 1999; Yang *et al.*, *Aquaculture* 342:48-55, 2012), la función reproductora (CH19950003453 19951207), el desarrollo y la supervivencia de peces y almejas (JP19800024343 19800227) y la resistencia al estrés generado por frío en cíclidos (Harpaz *et al.*, *J. Therm. Biol.* 24:57-62, 1999; CH19980000400 19980219). Además se ha demostrado que ejerce efecto protector frente a la penetración de xenobióticos aniónicos en guppies (Schreiber *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol.* 117C:99-102, 1997). No existiendo, hasta el momento, nada

publicado de LC con respecto a Cilindrospermopsina (CYN) objeto de esta invención y por tanto, siendo novedoso aportar el uso de la LC con respecto al tratamiento, prevención y/o recuperación de efectos inducidos por CYN en peces.

5

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.*, J. Am. Chem. Soc. 144:7941-7942, 1992), 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 ciprinídeos 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.

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.*, Toxicol. 32:833-843, 1994; Runnegar M.T. *et al.* Biochem. Pharmacol. 49:219-225, 1995) y disminuye los contenidos de Glutathion (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

35

estrés oxidativo en la patogénesis de CYN en peces (Gutierrez-Praena D. *et al.*, *Aquat. Tox.* 105:100-106, 2011; Puerto M. *et al.*, *Ecotoxicology* 20: 479-490, 2011), detectándose un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lipoperoxidación (LPO), oxidación de proteínas y de ADN 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, tan sólo el uso de la N-acetilcisteína ha demostrado actividad protectora en peces frente a la intoxicación por CYN (Gutierrez-Praena D. *et al.*, *Aquat. Toxicol.* 31: 1-8, 2012; P201101162, Cameán Fernández A. *et al.*, 2011). 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 las especies afectadas.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende LC 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 ha comprobado aumento de los niveles de peroxidación lipídica (LPO) y de oxidación de ADN, disminución de los niveles de GSH, en diferentes órganos (hígado, riñón) de peces expuestos a 400 µg CYN/kg pez de forma aguda por vía oral. Así mismo, CYN induce múltiples alteraciones histopatológicas en órganos diversos: hígado, riñón, tracto gastrointestinal, corazón y branquias.

La LC 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.

5

Además, el uso de LC 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 ADN (hígado, riñón) inducida por CYN, y prevenir 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 LC para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento, prevención y/o recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a CYN.

15

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

20

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) LC.

30

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.

35

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 LC. 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 L-Carnitina 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.

5 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
10 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
15 cualquier otro tipo de pez que presente alteraciones histopatológicas en un grado reversible.

En otra realización más preferida de la presente invención, la LC se administra en una cantidad diaria de entre 400 y 880 mg por Kg de peso del pez. Esta
20 administración se lleva a cabo durante al menos veintiún días. Preferiblemente la cantidad diaria incorporada a los peces es a partir de 400 mg por Kg de peso.

Esta composición, se puede administrar de distintas formas, entre ellas, pero sin limitarse, intraperitonealmente, oralmente, bucalmente,
25 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.

30 Preferiblemente los peces intoxicados están expuestos a más de 400 µg CYN/kg de pez por vía oral en exposición única (intoxicación aguda).

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

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción de la sustancia activa (en la presente invención, LC), 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.

5 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

10 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.

15 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.

20 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

25 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.

30

La LC 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

35 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.

5 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
10 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.*

15 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*,
20 *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.*
25 *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).

30

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
35 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

5

FIG. 1. Muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de LC sobre la LPO en hígado y riñón de tilapias expuestas a 400 µg CYN/kg pez.

Medidas de LPO en hígado y Medidas de LPO en riñón.

10

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

15

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 LC con respecto a sus respectivos grupos control y (b) comparación del grupo tratado con CYN y LC (400 ó 880 mg LC/Kg pez/día)

20

con su respectivo grupo no tratado con LC.

FIG. 2. Muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de LC sobre la oxidación de ADN en hígado y riñón de tilapias expuestas a 400 µg CYN/kg pez

25

Medidas de oxidación de ADN (sitios AP; 100.000 pb).

Donde: el eje Y representa los valores de los sitios apurínicos/ apirimidínicos por cada 100.000 pares de bases cuantificados como medida de la oxidación de ADN expresados como media ± error estándar (n=8). Los niveles de significación, es decir, que al comparar entre los grupos seleccionados la

30

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 LC con respecto a sus respectivos grupos control y (b) comparación del grupo tratado con CYN y LC (400 ó 880 mg LC/Kg pez/día) con su respectivo grupo no tratado con LC.

5

FIG 3. Muestra el efecto protector de diferentes concentraciones de LC sobre el cociente GSH/GSSG en hígado y riñón de tilapias expuestas a 400 µg CYN/kg pez

Medidas del cociente Glutación reducido/glutación oxidado (GSH/GSSG)

10 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 LC con respecto a sus respectivos grupos control y (b) comparación del grupo tratado con CYN y LC (400 ó 880 mg LC/Kg pez/día) con su respectivo grupo no tratado con LC.

15

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

20

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

25

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

30

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

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

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

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

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

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

15 A, B, C, D, I, K, M, Ñ, P: Observaciones al microscopio óptico, tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 100 µm.
20 B, D, F, H, J, L, N, O, Q: Observaciones ultraestructurales al microscopio electrónico de barrido (SEM: scanning electron microscope). Las barras miden 10 µm.

25 MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

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

30

EJEMPLO 1

35 La invención se llevó a cabo empleando un total de 72 peces macho de *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia), de peso medio $55,2 \pm 6,77$ 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 9 grupos experimentales con 8 animales en cada uno. Los peces fueron intoxicados con la toxina CYN pura (pureza > 95%, Alexis Corporation, Lausen, Suiza) ó mediante la administración de células liofilizadas de un cultivo de *Aphanizomenon ovalisporum* LEGE X-001 productor de CYN, en ambos casos por vía oral (mezclado con la comida comercial para peces). La administración de LC se realizó también a través del pienso, empleando dos niveles de dosis, 400 y 880 mg LC/Kg pez/día. Cada grupo fue introducido en un acuario independiente:

Acuario 1: peces control, alimentados solo con pienso normal durante 21 días

Acuario 2: peces alimentados con pienso durante 21 días e intoxicados con CYN (dosis única de 400 µg CYN/kg pez) procedente de un estandar puro.

Acuario 3: peces alimentados con pienso durante 21 días, intoxicados con CYN (dosis única de 400 µg CYN/kg pez) procedente de un cultivo liofilizado de *Aphanizomenon ovalisporum* productor de la misma.

Acuarios 4 y 5: Peces alimentados con pienso + LC, a las dosis de 20 y 45 mg LC/pez/día (equivalentes a 400 y 880 mg LC/Kg pez/día) durante 21 días.

Acuarios 6 y 7: Peces con pienso+ LC (400 y 880 mg LC/Kg pez/día) durante 21 días, e intoxicados con una dosis única de 400 µg CYN/kg pez.procedente de estándar puro.

Acuarios 8 y 9: Peces con pienso+ LC (400 y 880 mg LC/Kg pez/día) durante 21 días, e intoxicados con una dosis única de 400 µg CYN/kg pez.procedente de un cultivo liofilizado de *Aphanizomenon ovalisporum* productor de la misma.

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.*(Aquat. Toxicol. 105: 100-106, 2011). 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 ADN mediante la determinación de los sitios apurínicos/ apirimidínicos por cada 100.000 pares de bases 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.* (Toxicol. Pathol. 36:449-458, 2008), incluyendo en el caso de las branquias microscopia óptica y electrónica de barrido (SEM).

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 la toxina CYN (procedente de células liofilizadas de un cultivo de *Aphanizomenon ovalisporum* o de estándar puro) incrementa la lipoperoxidación (LPO) en hígado (2,1 veces y 1,7 respectivamente), y en riñón (1,4 veces y 1,5 respectivamente) frente al control, y los efectos protectores de LC se demuestran con las dos dosis ensayadas.
- 2) En la FIG. 2 se observa como CYN procedente de células liofilizadas de un cultivo de *Aphanizomenon ovalisporum* aumenta la oxidación de ADN en hígado y riñón (1,3 veces y 1,4 respectivamente) en relación al control, y los efectos protectores de LC se demuestran con las dos dosis ensayadas.
- 3) La FIG. 3 muestra la disminución de los cocientes GSH/GSSG en hígado y riñón de los peces intoxicados con CYN, y la aplicación de ambas dosis de LC mejoró este parámetro.

EJEMPLO 2. LC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en hígado.

El estudio histopatológico del hígado de los peces pertenecientes a los lotes tratados con CYN puso en evidencia un proceso degenerativo que consistió en una desorganización del parénquima hepático con presencia de glucógeno en el citoplasma del hepatocito y ciertas gotas de grasa (FIG. 4 G, H, I, J), frente a una ausencia de lesiones del grupo control (FIG. 4 A, B) caracterizada por

cordones hepáticos normales, con hepatocitos con una morfología poliédrica normal.

5 En los dos lotes de peces tratados exclusivamente con LC se observó que, con ambas dosis (400 y 880 mg LC/Kg pez/día) no existían lesiones hepáticas y presentan una morfología aparentemente normal (FIG. 4 C, D, E, F). En los lotes de peces a los que junto a la toxina CYN se les administró 400 mg LC/kg pez/día presentan un parénquima con una morfología aparentemente normal con ausencia de grasa y glucógeno granular en el caso de la CYN procedente de liofilizado (FIG. 4 K, L) y un cierto contenido de glucógeno pero sin llegar a ser un proceso patológico en el caso de CYN pura (FIG. 4 M, N).

15 El estudio de los peces del lote a los que junto con CYN (procedente de liofilizado o pura) se les administró una dosis de 880 mg LC/Kg pez/día mostró un parénquima hepático aparentemente normal con recuperación total de las lesiones provocadas por la toxina, tanto al microscopio óptico, como al electrónico (FIG. 4 Ñ, O, P, Q).

20 A, B: Hígado de los peces control. **A.** Cordones hepáticos normales, hepatocito con una morfología aparentemente normal. **B.** Detalle de hepatocito aparentemente normal, con organoides citoplasmáticos, retículos y mitocondrias.

25 C, D: Tilapias tratadas con LC (400 µg/kg pez/día). **C.** Parénquima con una morfología aparentemente normal, con los hepatocitos dispuestos en cordones y zona pancreática aparentemente normal. **D.** Detalle de hepatocito aparentemente normal con organoides citoplasmáticos y ausencia de grasa y glucógeno granular.

30 E, F: Tilapias tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **E.** Parénquima con una morfología aparentemente normal, 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.

35 G, H: Hígado de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado (400 µg CYN/Kg pez). **G.** Parénquima hepático desorganizado, hepatocitos con presencia de glucógeno (círculos). **H.** El hepatocito presenta gran contenido de glucógeno en el citoplasma (círculo) y gotas lipídicas (flecha).

I, J: Hígado de peces expuestos a CYN pura (400 µg LC/Kg pez). I. Parénquima hepático desorganizado, hepatocitos con presencia glucógeno (círculo) y de vesículas de grasa (flecha). J. El hepatocito presenta con un citoplasma con escasos organoides y el resto del citoplasma repleto de

5 grasa (círculo) y cierta presencia de glucógeno granular (flecha).
K, L: Hígado de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas con LC (400 mg LC/Kg pez/día). K. Parénquima con una morfología aparentemente normal, con los hepatocitos dispuestos en cordones aparentemente normales. L. Detalle de hepatocito aparentemente normal

10 con organoides citoplasmáticos y ausencia de grasa y glucógeno granular.
M, N: Hígado de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (400 mg LC/Kg pez/día). M. Cordones hepáticos normales, con cierta morfología poliédrica con núcleo central y citoplasma claro con escaso contenido en glucógeno (círculo). N. Detalle de hepatocito con cierto contenido en

15 glucógeno (círculo).
Ñ, O: Hígado de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). Ñ. Parénquima hepático aparentemente normal. O. Detalle de hepatocito aparentemente normal.

20 P, Q: Hígado de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). P. Cordones hepáticos normales, pero con cierta morfología poliédrica con núcleo central y citoplasma sin contenido de glucógeno. Q. Detalle de hepatocito aparentemente normal.

25 **EJEMPLO 3. LC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en riñón.**

Morfológicamente los riñones de los peces de los lotes tratados con CYN (procedente de liofilizado o pura) mostraron una glomerulopatía, observándose

30 al microscopio óptico una atrofia glomerular y dilatación de la capsula de Bowman y al microscopio electrónico se observa esta glomerulopatía con tumefacción e incluso pérdida de las microvellosidades de los túbulos contorneados proximales (FIG. 5 G, H, I, J). Los riñones de los peces del lote control presentaron una estructura aparentemente normal (FIG. 5 A, B).

35

El estudio de los peces de los lotes tratados solamente con las dosis de LC (400 y 880 mg LC/Kg pez/día) no mostró ninguna lesión renal (FIG. 5 C, D, E, F).

En los peces a los que se les administró CYN (procedente de liofilizado o pura) junto con 400 ó 880 mg LC/Kg pez/día se observó estructuralmente y
5 ultraestructuralmente una morfología del parénquima renal totalmente normal (FIG. 5 K, L, M, N, Ñ, O, P, Q).

A, B: Riñón de los peces control.

C, D: Tilapias tratadas con LC (400 µg/kg pez/día). **C.** Glomérulos y túbulos aparentemente normales. **D.** Glomérulo con podocito aparentemente normal.
10 E, F: Tilapias tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **E.** Glomérulos y túbulos aparentemente normales. **F.** Túbulo contorneado proximal aparentemente normal.

G, H: Riñón de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado (400 µg
15 CYN/Kg pez). **G.** Glomerulopatía y atrofia glomerular (circulo), tubulonefrosis y dilatación de la capsula de Bowman (flecha) y ligera tubulonefrosis (estrella). **H.** Microvellosidades de los túbulos contorneados proximales tumefactos y pérdidas de estas (circulo).

I, J: Riñón de peces expuestos a CYN pura (400 µg LC/Kg pez). **I.**
20 **I.** Glomerulopatía (circulo), atrofia glomerular (estrella), dilatación de la capsula de Bowman y tubulonefrosis (flecha). **J.** Tubulonefrosis de túbulos contorneados proximal con células engrosadas e hialinizadas (flechas).

K, L: Riñón de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas
25 con LC (400 mg LC/Kg pez/día). **K.** Glomérulos y túbulos aparentemente normales. **L.** Membrana basal aparentemente normal.

M, N: Riñón de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (400 mg
LC/Kg pez/día). **M.** Glomérulos y túbulos aparentemente normales. **N.** Túbulo contorneado proximal aparentemente normal, con abundantes microvellosidades.

Ñ, O: Riñón de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas
30 con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **Ñ.** Glomérulos y túbulos aparentemente normales. **O.** Túbulo contorneado proximal aparentemente normal.

P, Q: Riñón de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (880 mg
35 LC/Kg pez/día). **P.** Glomérulos y túbulos aparentemente normales. **Q.** Detalle de túbulo contorneado distal aparentemente normal y con abundantes mitocondrias.

EJEMPLO 4. LC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en corazón.

5

El estudio histopatológico realizado sobre peces tratados con CYN (procedente de liofilizado o pura) mostraron al microscopio óptico procesos de miofibrosis, con pérdida de miofibrillas, presencia de edemas y hemorragias (FIG 6. G,I). Al microscopio electrónico se observa una pérdida de las miofibrillas (FIG. 6 H, J).

10

El corazón de los peces del lote control presentó una estructura aparentemente normal (FIG. 6 A, B).

Los peces tratados solo con LC (400 y 880 mg LC/Kg pez/día) presentan una morfología de las fibras cardíacas similares a las del grupo control (FIG. 6 C, D, E, F).

15

No se observaron lesiones en los tratados con ambas dosis de LC (400 ó 880 mg LC/Kg pez/día) y expuestos a CYN (FIG. 6 K, L, M, N, Ñ, O, P, Q).

A, B: Corazón de los peces control.

20

C, D: Tilapias tratadas con LC (400 µg/kg pez/día). C. Fibras musculares aparentemente normales. D. Detalle de miofibrillas aparentemente normales, con bandas perfectamente dispuestas y normales.

E, F: Tilapias tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). E. Fibras musculares aparentemente normales. F. Detalle de miofibrillas con material contráctil intacto, con bandas perfectamente dispuestas y normales

25

G, H: Corazón de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado (400 µg CYN/Kg pez). G. Miofibrosis, pérdida de miofibrillas (flecha), ciertos edemas (estrella) y hemorragias (círculo). H. Pérdida y desintegración de las miofibrillas (círculo)

30

I, J: Corazón de peces expuestos a CYN pura (400 µg LC/Kg pez). I. Miofibrosis con pérdida de miofibrillas (círculos), abundantes edemas (estrella) y ciertas hemorragias (flecha). J. Pérdida y desintegración de las miofibrillas (círculo).

35

K, L: Corazón de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas con LC (400 mg LC/Kg pez/día). K Fibras musculares

aparentemente normales pero ciertas hemorragias (círculo). **L.** Detalle de miofibrillas normales sin pérdida de material contráctil.

5 **M, N:** Corazón de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (400 mg LC/Kg pez/día). **M.** Fibras musculares aparentemente normales. **N.** Detalle de miofibrillas normales sin pérdida de material contráctil.

Ñ, O: Corazón de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **Ñ** Fibras musculares aparentemente normales. **O.** Detalle de miofibrillas aparentemente normales.

10 **P, Q:** Corazón de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **P.** Fibras musculares aparentemente normales. **Q.** Detalle de miofibrillas aparentemente normales.

15 **EJEMPLO 5. LC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en intestino.**

A nivel de intestino en los peces tratados con CYN (procedente de liofilizado o pura) se observaron procesos de enteritis con necrosis de enterocitos al microscopio óptico y pérdida manifiesta de microvellosidades al microscopio electrónico (FIG. 7 G, H, I, J), en comparación con el grupo control (FIG. 7 A, B).
 20 Tras la administración de las dos dosis de LC (400 y 880 mg LC/Kg pez/día) solo se observó una actividad manifiesta de las células caliciformes, sin interés patológico (FIG. 7 C, D, E, F), al igual que en los grupos de peces a los que se les administró LC junto con CYN (FIG. 7 K, L, M, N, Ñ, O, P, Q), mostrando así
 25 ambas dosis de LC un efecto protector frente a la toxina.

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

30 **C, D:** Tilapias tratadas con LC (400 µg/kg pez/día). **C.** Vellosidades aparentemente normales con enterocitos aparentemente normales y abundantes células caliciformes (flecha). **D.** Enterocitos con abundantes células caliciformes aparentemente normales (flechas).

35 **E, F:** Tilapias tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **E.** Vellosidades aparentemente normales con enterocitos aparentemente normales y

- abundantes células caliciformes (flecha). **F.** Enterocitos con abundantes microvellosidades (circulo).
- G, H: Intestino de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado (400 µg CYN/Kg pez). **G.** Detalle de vellosidades intestinales con enterocitos necrosados (circulo) **H.** Detalle de enterocito con pérdida parcial de las microvellosidades (circulo).
- I, J: Intestino de peces expuestos a CYN pura (400 µg LC/Kg pez). **I.** Detalle de vellosidades intestinales con enterocitos necrosados (circulo) **J.** Detalle de enterocito con pérdida parcial de las microvellosidades (circulo).
- K, L: Intestino de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas con LC (400 mg LC/Kg pez/día). **K.** Vellosidades aparentemente normales con enterocitos aparentemente normales y abundantes células caliciformes (flecha). **L.** Enterocitos aparentemente normales con abundantes microvellosidades (circulo).
- M, N: Intestino de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (400 mg LC/Kg pez/día). **M.** Vellosidades aparentemente normales con enterocitos aparentemente normales y abundantes células caliciformes (flecha). **N.** Enterocitos con abundantes microvellosidades (circulo).
- Ñ, O: Intestino de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **Ñ.** Vellosidades aparentemente normales con enterocitos aparentemente normales y abundantes células caliciformes (flecha). **O.** Enterocitos aparentemente normales con abundantes microvellosidades (circulo).
- P, Q: Intestino de peces expuestas a CYN pura y tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **P.** Vellosidades aparentemente normales con enterocitos aparentemente normales y abundantes células caliciformes (flecha). **Q.** Enterocitos con abundantes microvellosidades (circulo).

EJEMPLO 6. LC mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en branquias.

Al microscopio óptico las branquias de los peces tratados con CYN pura presentaron, a nivel de las laminillas,, procesos de hiperemia y hemorragia (FIG. 8 I, J), siendo estas lesiones más manifiestas en los peces tratados con CYN procedente de liofilizado (FIG. 8 G, H). Al microscopio electrónico de barrido

pueden observarse infiltrados inflamatorios, erosión y tumefacción de la superficie lamelar (FIG. 8 G, H, I, J).

5 Estas lesiones no fueron observadas en el lote control (FIG. 8 A, B), ni en los peces tratados con LC (400 ó 880 mg LC/Kg pez/día) (FIG. 8 C, D, E, F), ni en los grupos de a los que se les administró LC junto con CYN (FIG. 8 K, L, M, N, Ñ, O, P, Q), que presentaron una morfología aparentemente normal. Se muestra así el efecto protector de ambas dosis de LC frente a CYN.

10 A, B: Branquias de los peces control.

C,D: Tilapias tratadas con LC (400 µg/kg pez/día). Estructura aparentemente normal.

E,F: Tilapias tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). Estructura aparentemente normal.

15 G, H: Branquias de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado (400 µg CYN/Kg pez). **G.** Detalle de filamento branquial con presencia procesos de hiperemia (flecha) y hemorragias en laminillas secundarias (circulo). **H.** Arco branquial con superficie erosionada y tumefacta (círculo).

I, J: Branquias de peces expuestos a CYN pura (400 µg LC/Kg pez). **I.** Detalle de filamento branquial con hiperemia en laminillas secundarias (flecha) y hemorragias (círculo). **J.** Arco branquial con pérdida de continuidad, erosionado e infiltrado celular (circulo).

20 K, L: Branquias de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas con LC (400 mg LC/Kg pez/día). **K.** Filamento branquial aparentemente normal. **L.** Arco branquial aparentemente normal.

25 M, N: Branquias de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (400 mg LC/Kg pez/día). **M.** Filamento branquial aparentemente normal. **N.** Arco branquial aparentemente normal.

30 Ñ, O: Branquias de tilapias expuestas a CYN procedente de liofilizado y tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **Ñ.** Filamento branquial aparentemente normal. **O.** Arco branquial aparentemente normal.

35 P, Q: Branquias de peces expuestos a CYN pura y tratadas con LC (880 mg LC/Kg pez/día). **P.** Filamento branquial aparentemente normal. **Q.** Arco branquial aparentemente normal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición que comprende L-Carnitina para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de efectos tóxicos en peces expuestos a cilindrospermopsina.
- 10 2. Uso de una composición que comprende L-Carnitina, según reivindicación 1, para la elaboración de un medicamento útil en la recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a cilindrospermopsina.
- 15 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde los efectos tóxicos son alteraciones histopatológicas.
- 20 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.
- 25 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la L-Carnitina se administra en una cantidad diaria de entre 400 y 880 mg LC/Kg pez/día.
- 30 6. Uso según la reivindicación 5, donde la composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral o intraperitoneal.
- 35 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.

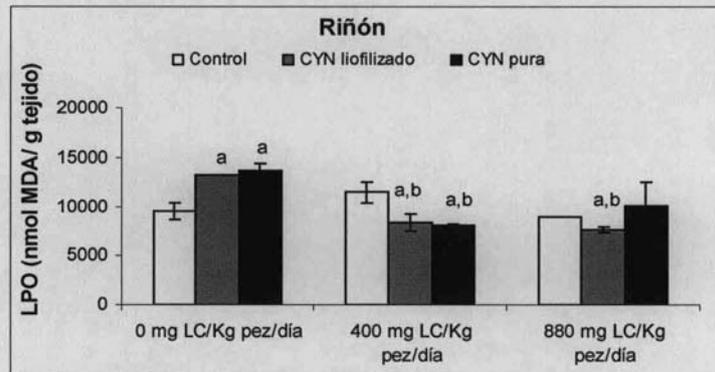
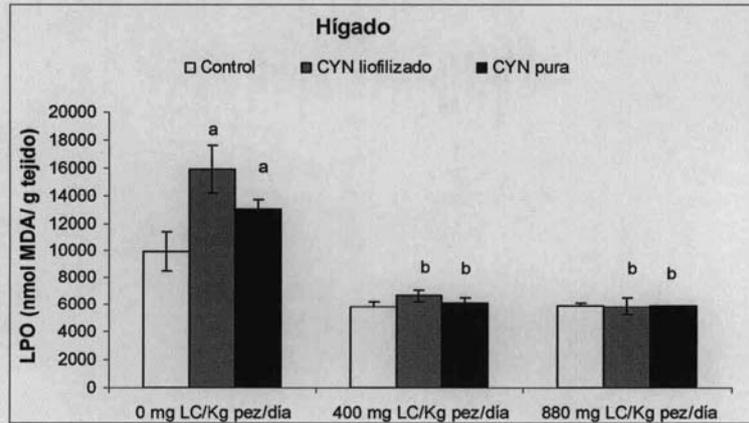


FIG. 1

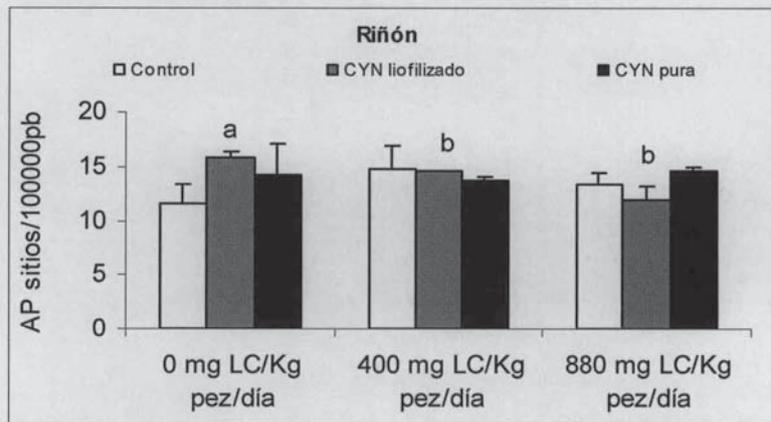
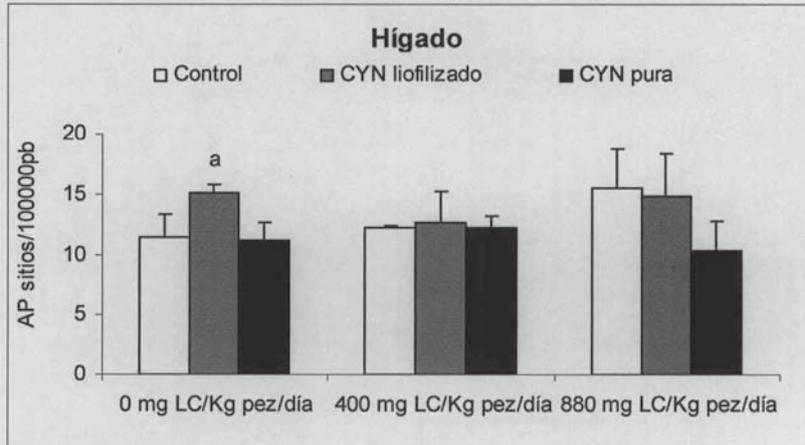


FIG. 2

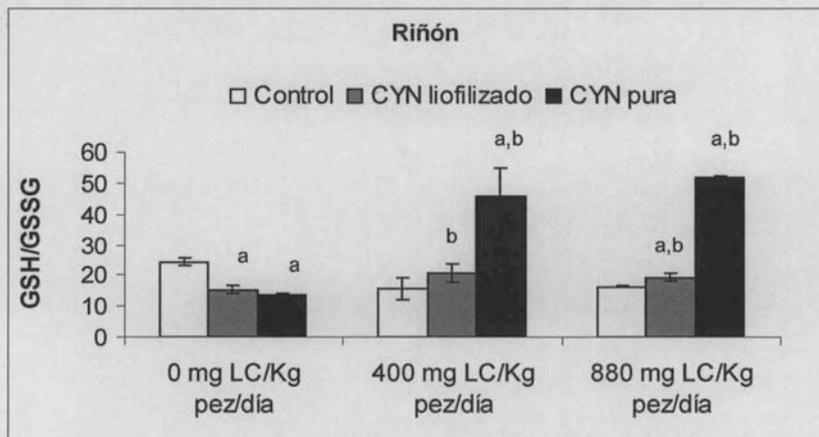
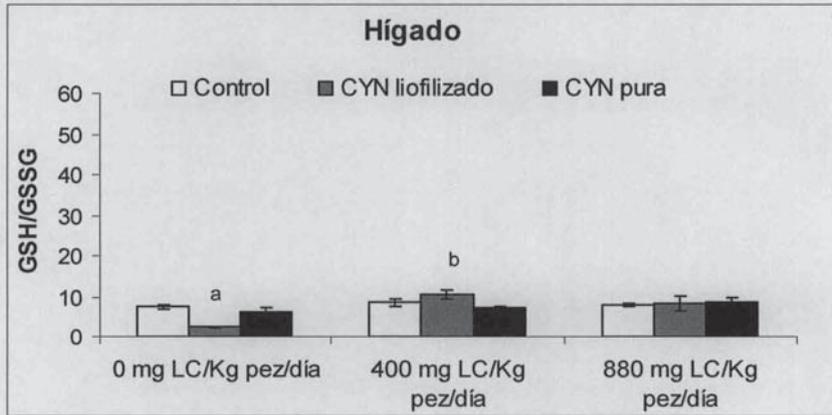
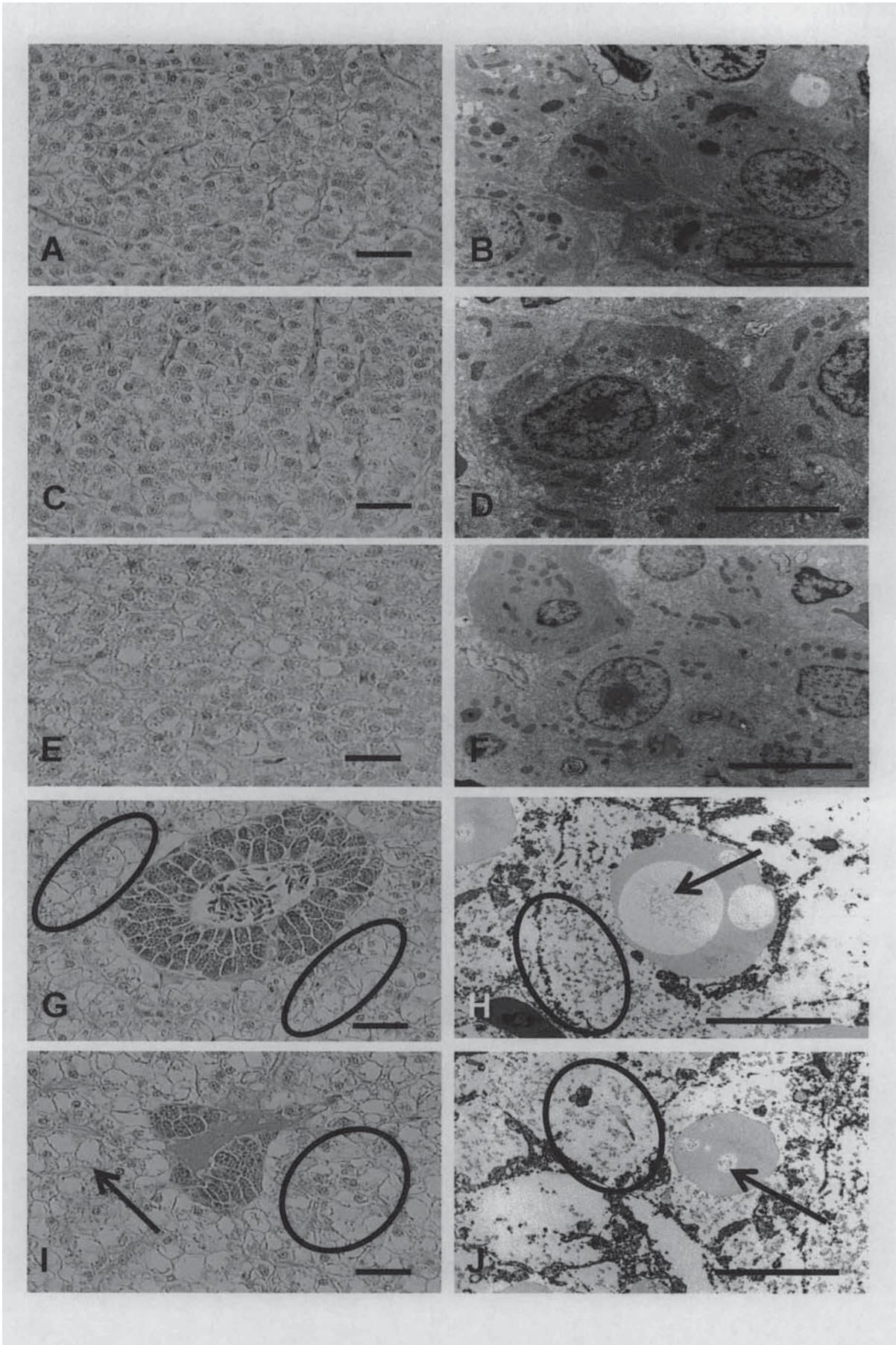


FIG. 3



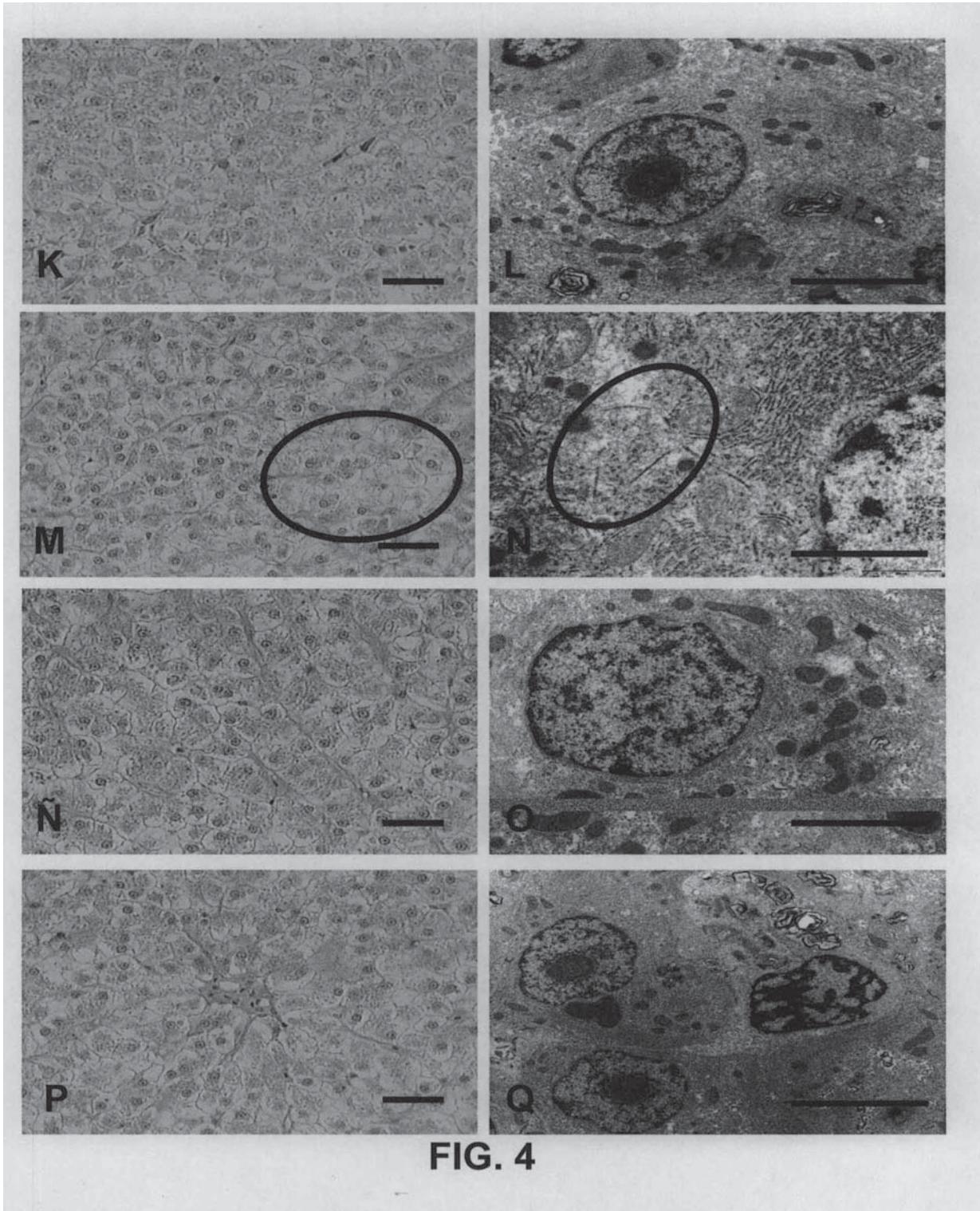
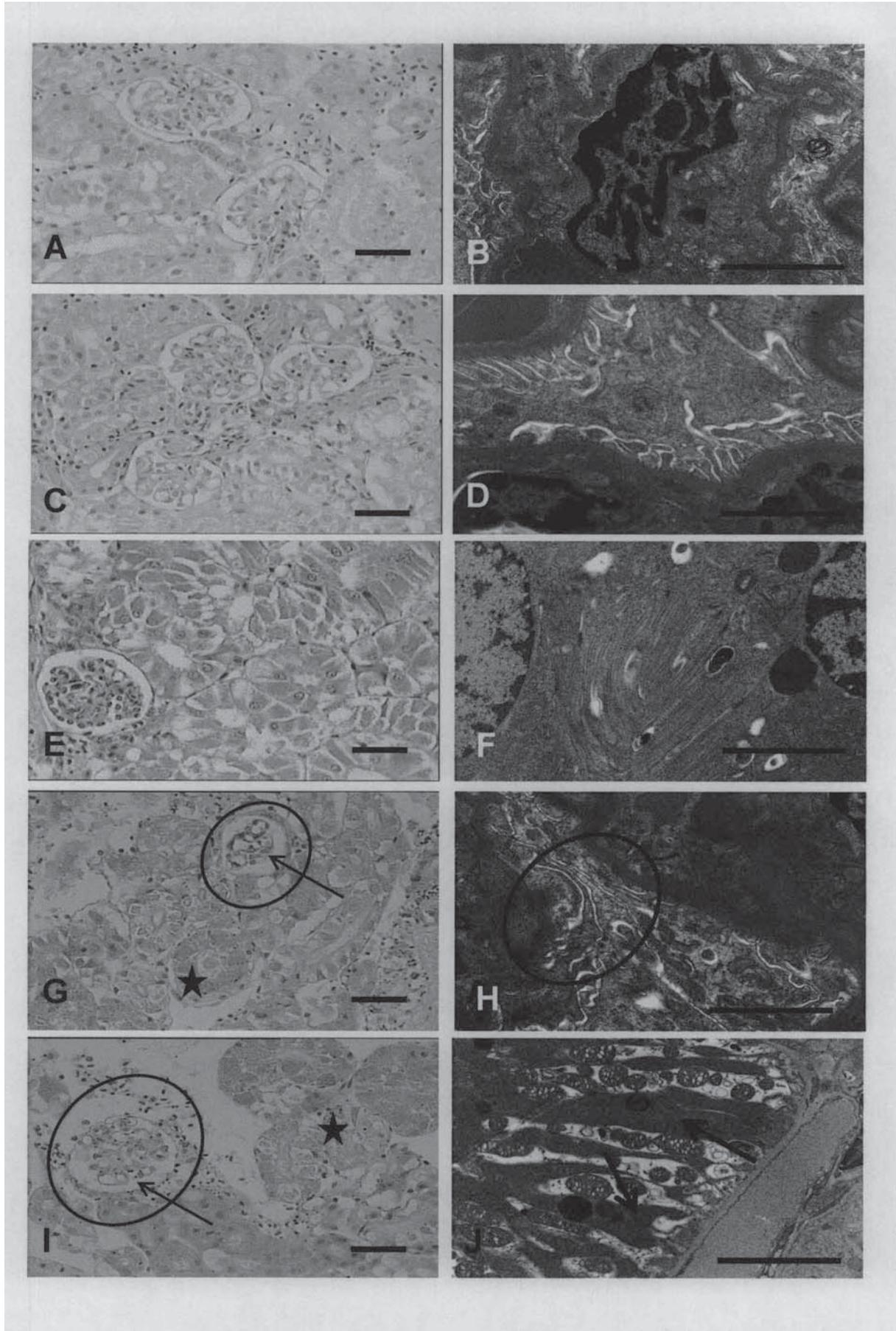


FIG. 4



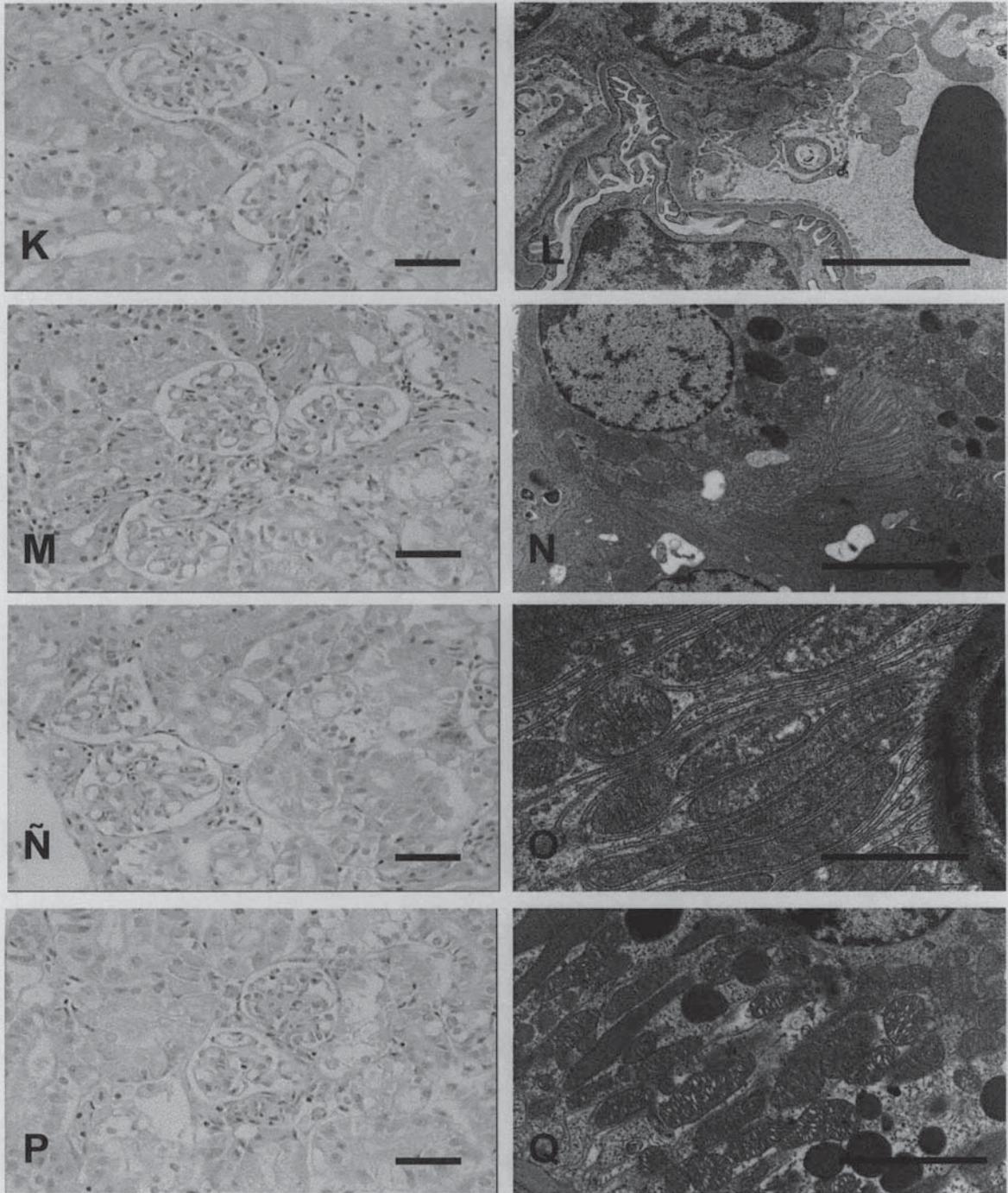
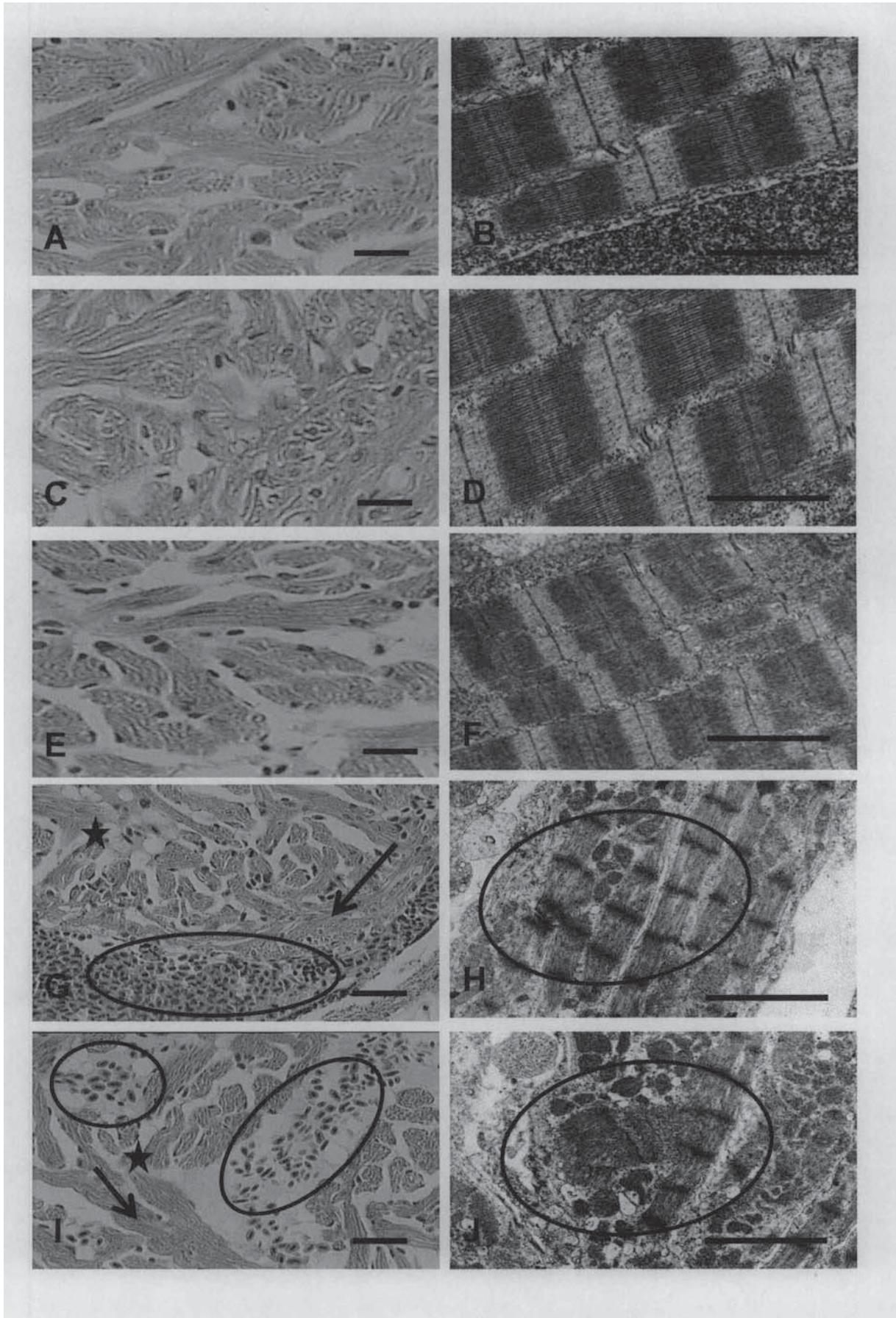


FIG. 5



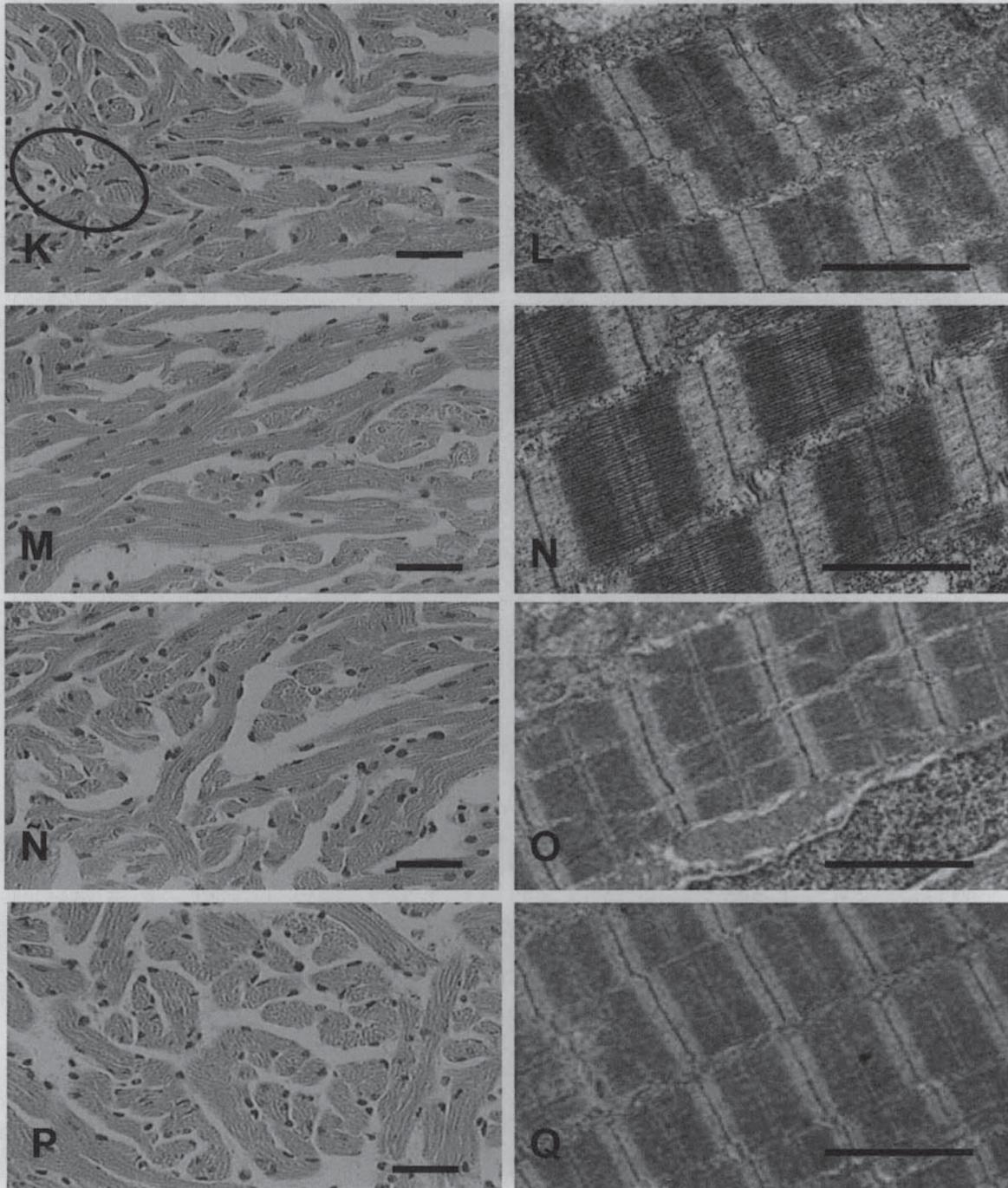
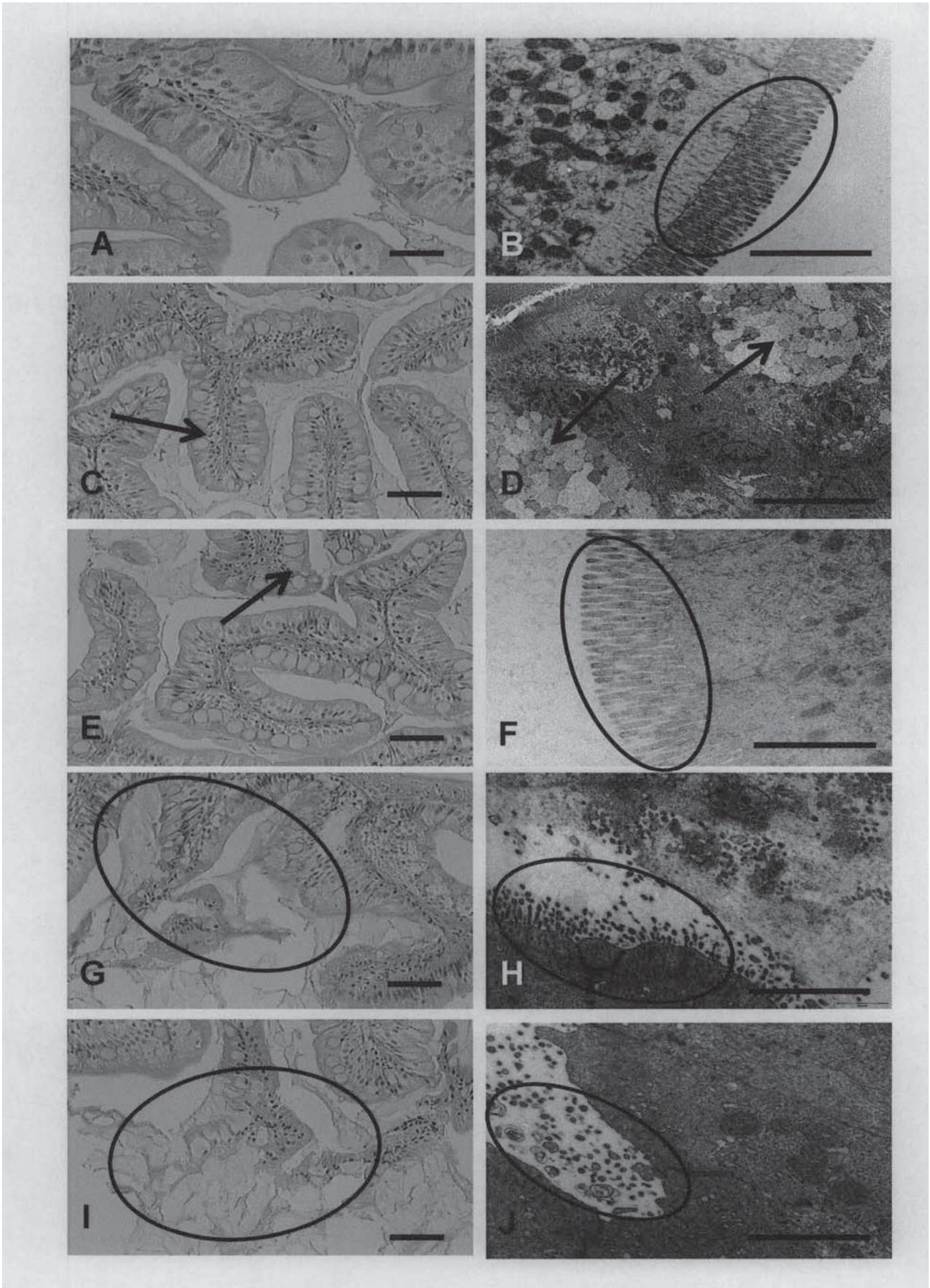


FIG. 6



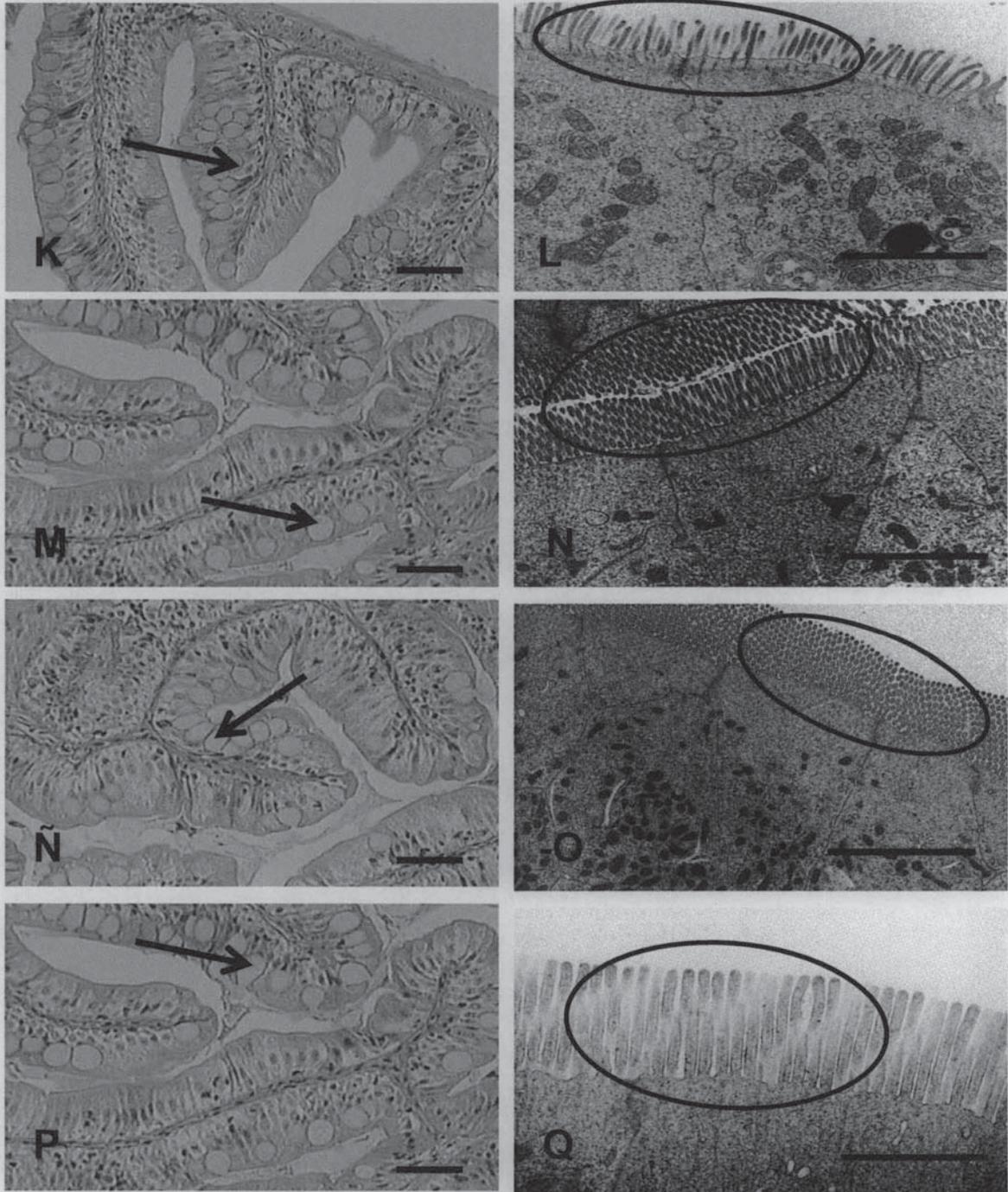
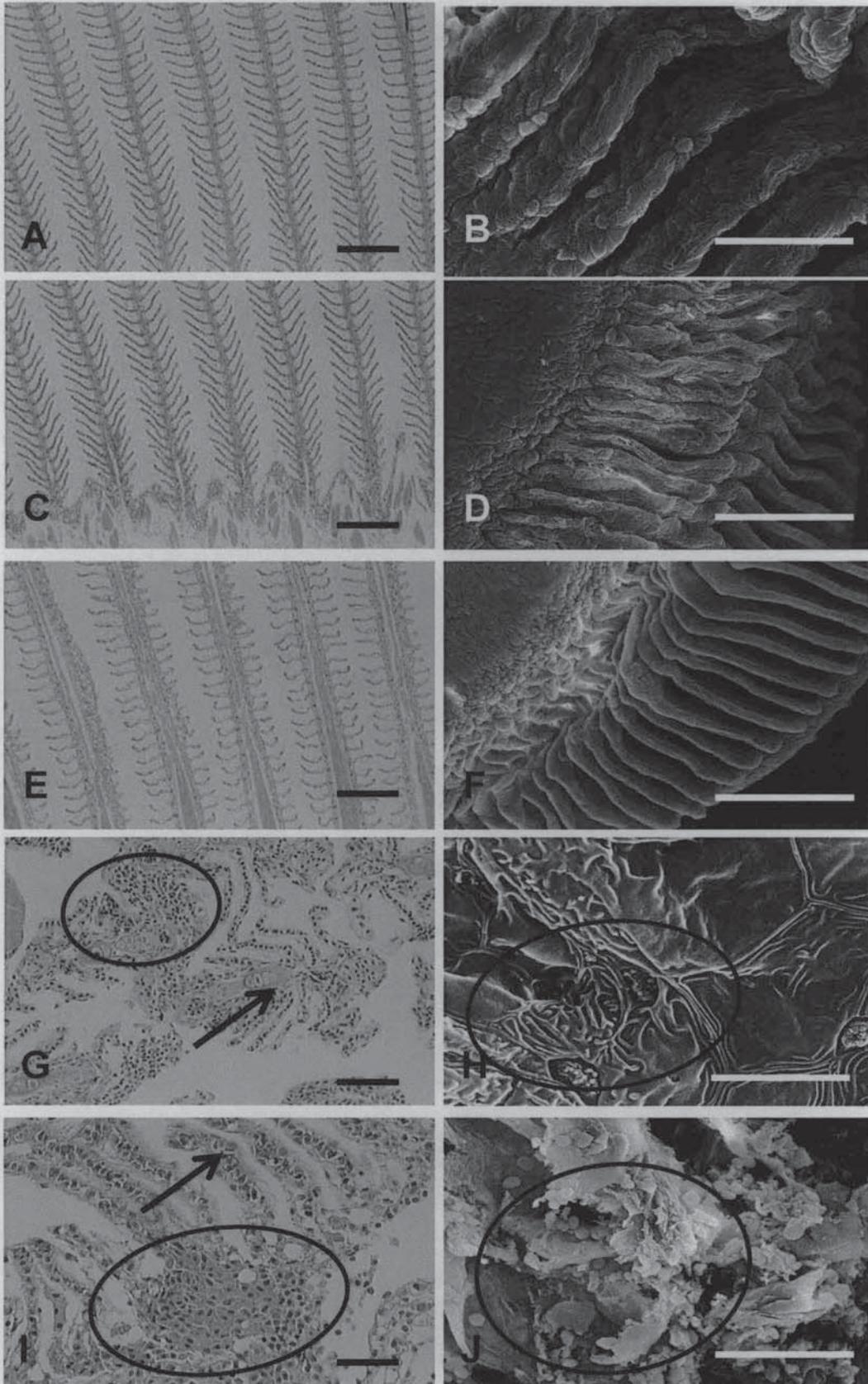


FIG. 7



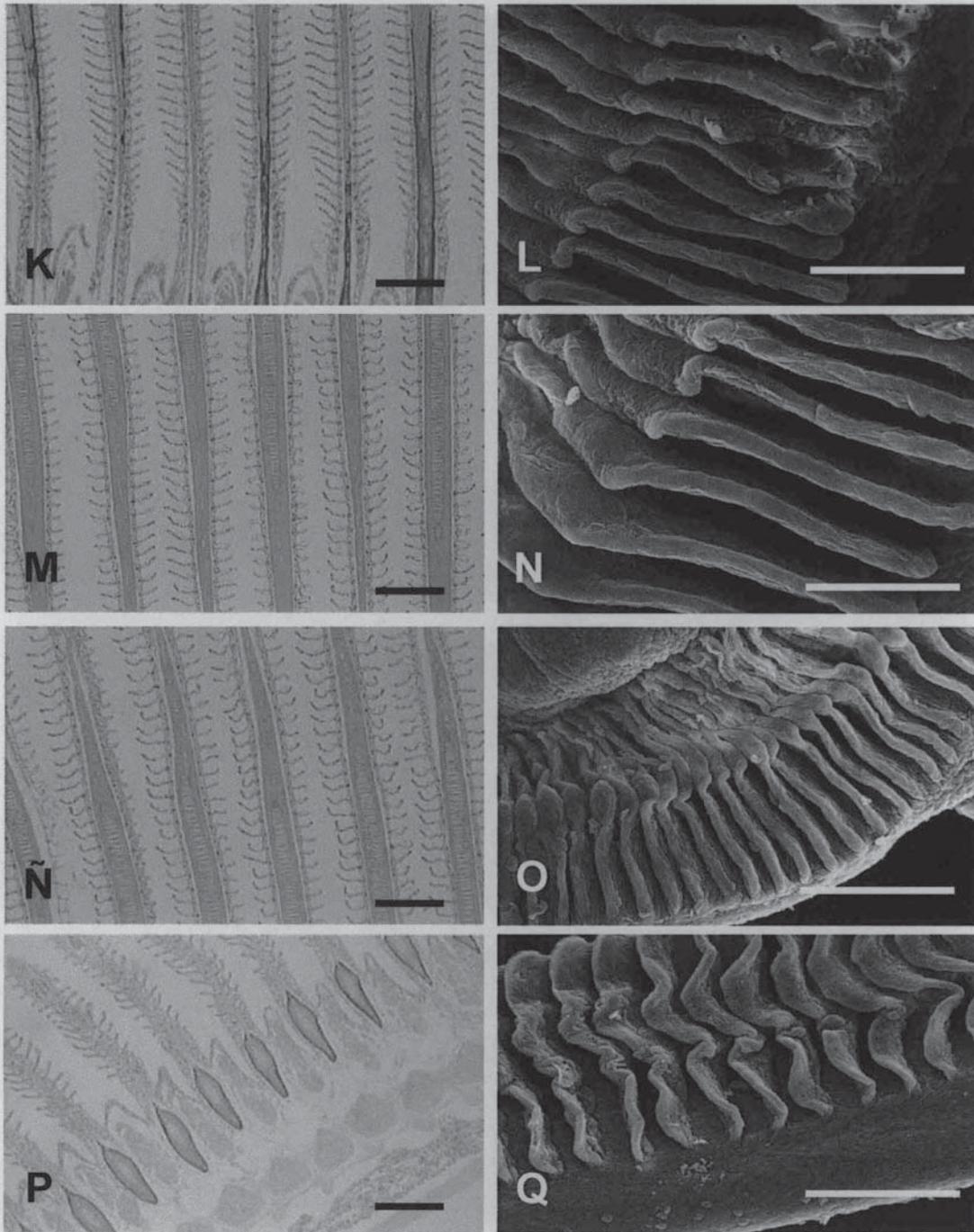


FIG. 8



21 N.º solicitud: 201201151

22 Fecha de presentación de la solicitud: 08.11.2012

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 DANIEL et al. Protective role of dietary N-acetylcysteine on the oxidative stress induced by cylindrospermopsin in tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>). Environmental toxicology and chemistry, 2012. Vol. 31 (7). ISSN 1552-8618 (Electronic) Doi: doi:10.1002/etc.1838 pubmed:22511408, páginas 1548-1555.	1-13
A	SCHREIBER S. et al. Dietary L-Carnitine Protects the Gills and Skin of Guppies (<i>Poecilia reticulata</i>) Against Anionic Xenobiotics. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. PART C: COMPARATIVE PHARMACOLOGY TOXICOLOGY, 19970501 ELSEVIER SCIENCE, OXFORD, GB, 1997. Vol. 117 (1) ISSN 0742-8413 Doi: doi:10.1016/S0742-8413(96)00230-7, páginas: 99-102.	1-13
A	WO 9105554 A1 (UNIV GEORGIA RES FOUND et al.) 02.05.1991, todo el documento.	1-13
A	US 2001043983 A1 (HAMILTON NATHAN D.) 22.11.2001, párrafos 10,16,22,24.	1-13
A	HARPAZ S. et al. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition-a review. Aquaculture, 2005, Vol. 249 (1-4) ISSN 0044-8486, páginas: 3-21.	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
17.02.2014

Examinador
A. I. Polo Díez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/205 (2006.01)

A23K1/18 (2006.01)

A23K1/16 (2006.01)

A61P39/00 (2006.01)

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

A61K, A23K, A61P

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, BDTXTE, MEDLINE, BIOSIS, FSTA, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.02.2014

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 DANIEL et al.	2012
D02	SCHREIBER S et al.	1997
D03	WO 9105554 A1	02.05.1991
D04	US 2001043983 A1	22.11.2001
D05	HARPAZ et al.	2005

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 la primera y segunda reivindicación, al uso de composiciones que comprenden L-carnitina para la elaboración de medicamentos útiles para el tratamiento y/o prevención y/o recuperación de los efectos tóxicos en peces expuestos a cilindrospermopsina (CYN)

Las reivindicaciones dependientes 3 a 13 aportan detalles sobre el uso de las reivindicaciones 1 y 2.

El documento D1 propone la utilización de la N-acetilcisteína (NAC) en la dieta para proteger a la tilapia de los efectos tóxicos que produce la exposición a las cilindrospermopsinas. La NAC es un precursor del glutatión, además de estimular las enzimas implicadas en el ciclo del GSH (Glutation-reductasa, gamma-glutamylcisteina sintetasa, glutatión-S-transferasa). Por todo ello, su ingestión contrarresta la inhibición de la síntesis de Glutation y el estrés oxidativo que produce la intoxicación con CYN.

El documento D2 demuestra el efecto protector de la L-carnitina frente a xenobióticos aniónico en peces de la especie *Poecilia reticulata*. Las membranas y capas epiteliales de las branquias y la piel de los peces a los que se les había administrado L-carnitina estaban protegidas frente a la entrada de xenobióticos aniónicos pero no de xenobióticos catiónicos (figura 1)

El documento D3 describe los efectos de alimentar un tipo de peces con un suplemento de carnitina. La L-carnitina, molécula implicada en la producción de energía metabólica, demostró ser útil para aumentar el crecimiento y para conferir resistencia frente a la toxicidad del amonio (ejemplo 3; reivindicación 9)

El documento D4 utiliza la L-carnitina junto con ácido lipóico como suplemento para animales de edad avanzada (entre los que se citan los peces) con objeto de aumentar su metabolismo mitocondrial (párrafo 16)

El documento D5 es una revisión sobre la función de la L-carnitina en peces.

Novedad y actividad inventiva (art. 6.2 y 8.2 de la L.P.)

Ninguno de los documentos citados en el estado de la técnica divulga ni sugiere el uso del L-carnitina para tratar o prevenir los efectos tóxicos en los peces expuestos a la toxina cilindrospermopsina.

El único compuesto que ha sido utilizado con éxito para tratar o prevenir los efectos tóxicos de la CYN en peces ha sido la NAC (documento D1), compuesto que no tiene similitud estructural con la L-carnitina, ni está involucrado en los mismos mecanismos fisiológicos.

Por otro lado, aunque la L-carnitina ha sido utilizado como suplemento alimenticio de los peces con muchas finalidades (ver documentos D2-D5): aumento de crecimiento, protección de ciertos xenobióticos, etc., no se deduce de manera evidente de estos documentos que la L-carnitina vaya a proteger a los peces de todo tipo de tóxicos y, en particular, de la intoxicación con CYN.

Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 1 a 13 tienen características que no se encuentran ni resultan evidentes del estado de la técnica, y por tanto cumplen el requisito de novedad y de actividad inventiva.