

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 808**

21 Número de solicitud: 201400428

51 Int. Cl.:

**A61K 31/355** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

**A23K 1/16** (2006.01)

**A61P 39/06** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**22.05.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.11.2015**

Fecha de la concesión:

**05.09.2016**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**12.09.2016**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (80.0%)**  
**Paseo de las Delicias s/n - Pabellón de Brasil**  
**41013 Sevilla (Sevilla) ES y**  
**UNIVERSIDAD DE CORDOBA (20.0%)**

72 Inventor/es:

**CAMEÁN FERNÁNDEZ, Ana María;**  
**REMEDIOS GUZMÁN, Guillén;**  
**PRIETO ORTEGA, Ana Isabel;**  
**MORENO NAVARRO, Isabel;**  
**JOS GALLEGO, Ángeles Mencía;**  
**PICHARDO SÁNCHEZ, Silvia;**  
**PUERTO RODRÍGUEZ, María;**  
**GUTIÉRREZ PRAENA, Daniel;**  
**MAISANABA HERNÁNDEZ, Sara;**  
**MOYANO SALVAGO, María Rosario y**  
**BLANCO RODRÍGUEZ, Alfonso**

54 Título: **Uso de vitamina E para proteger a los peces de la intoxicación por Cilindrospermopsina**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende vitamina E (vit E) 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, tracto gastrointestinal, branquias y/o cerebro. Además, dicha composición se utiliza para la fabricación de un alimento funcional, un complemento vitamínico, o un complemento nutricional.

ES 2 551 808 B1

DESCRIPCIÓN

**Uso de vitamina E para proteger a los peces de la intoxicación  
por Cilindrospermopsina**

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende vitamina E  
5 (vit E) 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, tracto gastrointestinal,  
branquias y/o cerebro. Además, dicha composición se utiliza para la fabricación de un  
10 alimento funcional, un complemento vitamínico, o un complemento nutricional.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La vitamina E (vit E) es un nutriente esencial sintetizado en la membrana de los  
15 cloroplastos por las plantas (Soll *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 238: 290-299,  
1985). Estructuralmente comprende una familia de compuestos poliprenoides  
formados por un anillo aromático con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide  
saturada, presentando en estado natural ocho isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ - tocoferol y  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  
 $\gamma$ ,  $\delta$  –tocotrienol) y siendo  $\alpha$ -Tocoferol la que ha mostrado una mayor actividad  
20 biológica en mamíferos (Peuthert and Pflugmacher, Toxicon 56: 411-417, 2010;  
Atkinson, Encyclopedia of biological chemistry (Second edition) pp 545-550, 2013;  
Traber, Encyclopedia of human nutrition (Third edition) pp 383-89, 2013). La  
vitamina E se encuentra ampliamente distribuida por todo el organismo estando  
presente en todas las células de los tejidos corporales (Pekmezci, Chapter eight in  
25 Vitamins & Hormones 86: 179-215, 2011).

Por su capacidad para eliminar radicales peroxilo, la función principal de la vit E es  
la de antioxidante formando parte de la primera línea de defensa frente a la  
peroxidación lipídica a nivel celular (Pekmezci, Chapter eight in Vitamins &  
30 Hormones 86: 179-215, 2011) contribuyendo a mantener la integridad de las  
membranas y la bioactividad celular (Traber and Atkinson, Free Rad. Biol. Med., 43:  
4-15, 2007). La vitamina E presenta efectos inmunomoduladores y juega un papel  
importante enfermedad isquémica cardíaca limitando la progresión de la  
aterosclerosis y en la carcinogénesis por sus propiedades antioxidantes frente al  
35 cáncer (Pekmezci, Chapter eight in Vitamins & Hormones 86: 179-215, 2011).

Asimismo se ha demostrado que la vit E protege, de forma dosis dependiente, el ADN de leucocitos mononucleares frente a oxidantes reactivos generados por neutrófilos activados (Staden, Mut. Res., 288: 257-262, 1993).

5 Son múltiples los usos descritos de la vit E principalmente en combinación con otras sustancias. Así, distintos trabajos y patentes de investigación la describen para  
 10 prevención y tratamiento de distintas patologías incluyéndola en formulaciones de vacunas antigripales para ancianos debido a su efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria (ES 2 420 829 T3). A nivel cardiovascular se describe su uso en  
 15 asociación con fenofibrato como medicación anti-ateroma, presentando sinergismo en la función protectora antioxidante de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) del plasma (ES 2 148 694 T3); en productos farmacéuticos o alimenticios en mezcla sinérgica con licopeno para la prevención de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (ES 2 218 833 T3); en formulaciones para administración oral que  
 20 ejerce un efecto reconstituyente sobre el sistema cardiovascular (ES 2 308 550 T3); en preparados para la prevención y tratamiento de dislipemias que incluyen nuevos ligandos de receptores activados por proliferador de peroxisomas (PPAR) que no causan retención de líquidos, edema o insuficiencia cardíaca (ES 2 385936 T3); como agentes bifuncionales que poseen actividad antioxidante y antiarrítmica  
 25 utilizados en el tratamiento de lesiones por isquemia-reperfusión, así como en enfermedades referidas a radicales libres y/o arritmias (ES 2 231 514 T3). Además, estudios epidemiológicos realizados en mujeres de mediana edad sugieren que el uso de suplementos de vit E se asocia con un menor riesgo de enfermedad coronaria (Stampfer, N. Engl. J. Med. 328: 1444-1449, 1993). Otros usos de la vit E se han descrito en formulaciones farmacéuticas que contienen productos activos antiinflamatorios (ES 2 215 101 T3); en composición antiulcerosa combinado con el ácido ascórbico (ES 2 046 229 T3); en solución o emulsión acuosa de ubiquinona, análogo o derivado, de uso oftálmico para reducir los efectos de estrés oxidativo a nivel del ojo y como solubilizante efectivo para la propia ubiquinona (ES 2 385037  
 30 T3); en procedimientos de encapsulación de ácidos grasos poliinsaturados (ES 2 357 965 T3) o en forma de derivado en composición farmacéutica con ciclosporina A y un emulsionante (ES 2 148 345 T3). Existen distintas patentes de investigación que recogen su uso en formulaciones cosméticas (ES 2382975 T3) como son composiciones cicatrizantes mejoradas para el tratamiento de una lesión causada  
 35 por el acné (ES 2 176 343 T3) y composiciones para el tratamiento de uñas junto

con aceite de soja o girasol (US 3887702 A). La vitamina E en combinación con la vitamina A, vitamina C y zinc forma parte de preparados para acelerar el brote del cabello (DE 19757921), disminuir su caída y/o favorecer su repigmentación (ES 2 282 213 T3, FR 760358) y junto con extractos de plantas, vitamina B6 y biotina en  
5 composición revitalizadora del cabello (ES 2 159 580 T3) y se ha descrito su uso en composiciones bucales (ES 2 043 856). También se ha demostrado su utilidad en combinación con otras sustancias en composiciones nutricionales. Concretamente, junto a beta-caroteno, vitamina C, selenio y otros compuestos ha mostrado utilidad para la prevención y tratamiento de caquexia y anorexia por cáncer (ES 2 210 523  
10 T3); junto a extracto de *Panax ginseng*, vitaminas y minerales en composición para la activación del sistema inmune (ES 2 343 119 T3); en preparados para la alimentación parenteral u oral de pacientes con función inmunológica debilitada (ES 2 187 595 T3); como suplemento dietético formando parte de un Kit nutricional infantil para regular el ciclo de sueño-vigilia (ES 2 259 885 A1) e incluso en la  
15 preparación de salsas culinarias y preparados alimenticios como alimento funcional graso rico en vitaminas (ES 2 264 866 B1). Se ha introducido el uso de la vit E en la práctica deportiva para mejorar la eficiencia energética de los atletas y los índices de rendimiento físico (ES 2 382115 T3) o junto con oligoelementos, vitaminas dermoprotectoras y otros antioxidantes en composiciones para aliviar el estrés del  
20 calor restaurando el equilibrio electrolítico debido a la sudoración en ausencia de ejercicio físico (ES 2 178 257 T3).

Concretamente en peces, se ha mostrado un requerimiento diario de vit E en distintas especies como el salmón Atlántico (120 mg / kg de dieta) (Hamre y Lie,  
25 1995., *Comp. Biochem. Physiol.*, 111 A:547-554, 1995) o la carpa común (200 a 300 mg / kg de dieta) (Watanabe *et al.*, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 43: 935-946, 1977; Wilson *et al.*, *J. Nutr.* 114: 2053-2058, 1984), describiéndose su uso en composiciones lipídicas marinas para alimentar organismos acuáticos (ES 2 320 851 T3). Además, se ha demostrado una mejora del sistema inmunitario y de la  
30 resistencia a enfermedades en la carpa herbívora (CN 102940157 A 20130227). Un aumento de vit E en la dieta de peces (de 300 a 1500 mg vit E / kg dieta) puede reducir la tasa de oxidación de lípidos en filetes de pescado, reducir la formación de sabores desagradables (Chaiyeapechara *et al.*, *Aquaculture* 219: 715-735, 2003) y mejorar la calidad del filete de especies como rodaballo (Ruff *et al.*, *Aquac. Nutr.* 9:  
35 91-103, 2003), así como mejorar la eficiencia de acumulación de vitaminas

lipofílicas en pescados y mariscos (JP 2001275578 A 20011009). Se ha demostrado que una disminución de vit E en la dieta de rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.), halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) y dorada (*Sparus aurata* L.) conlleva a actividades más altas de las enzimas antioxidantes en hígado y a niveles más altos de peróxidos lipídicos (Tocher *et al.* Aquac. Nutr. 8:195-207, 2002). Además se ha mostrado que un aumento del nivel de ácido graso poliinsaturado (PUFA) en la dieta de salmón Atlántico o carpa común provoca un aumento de las necesidades de vit E (Watanabe *et al.*, Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 43: 935-946, 1981; Schwarz *et al.*, Aquaculture 69: 57-67, 1988; Hamre and Lie, Aquaculture Res. 26: 175-184, 1995). Concretamente, en tilapias (*Oreochromis* sp) alimentadas con aceite oxidado se ha demostrado que un suplemento de vit E impidió el aumento de peroxidación lipídica (LPO) y aumentó el nivel de GSH en hígado (Huang and Huang, Aquaculture 237: 381-389, 2004). Se ha demostrado que la vit E mejora el efecto protector de la taurina frente a las mareas rojas en peces y crustáceos (JP S60110250 A 19850615). A pesar del papel protector que tiene la vit E, se conoce muy poco acerca de la modulación de la defensa antioxidante que ejerce en organismos acuáticos expuestos a cianotoxinas. Hasta el momento, solo se ha demostrado el efecto protector del pretratamiento con N-aceticisteína (NAC) (P200803360 de Cameán Fernández A, *et al.* 2011) y Selenio (Se) (P200803359 de Cameán Fernández A, *et al.* 2011) en tilapias (*Oreochromis niloticus*) expuestas a Microcistinas (MCs) y que la vit E modula las respuestas antioxidantes en cangrejos de estuario (*Chasmagnathus granulatus*) y en tilapias expuestas a MCs (Pinho *et al.*, Ecotoxicol. Environ. Saf. 61: 361-365, 2005; Prieto *et al.*, Environ Toxicol. Chem. 27: 1152-1159, 2007; Prieto *et al.*, Environ. Toxicol. 54: 563-579, 2008). No existiendo, por lo tanto, nada publicado de vit E con respecto a Cilindrospermopsina (CYN) objeto de esta invención y siendo novedoso aportar el uso de la vit E con respecto al tratamiento, prevención y/o recuperación de efectos inducidos por CYN en peces.

Por otro lado, la CYN es una toxina producida por cianobacterias tóxicas presentes en aguas superficiales, pertenecientes a trece especies de cianobacterias capaces de sintetizar CYN (*Anabaena lapponica*, *Anabaena planctonica*, *Anabaeana bergii*, *Aphanizomenon ovalisporum*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon flos-aquae var klebahnii*, *Aphanizomenon gracile*, *Cylindrospermopsis rasiborskii*, *Lyngbya wollei*, *Raphidiopsis mediterránea*, *Rapidiopsis curvata*, *Umezakia natans*,

*Oscillatoria* sp. PCC 6506) que se reparten en cuatro de los cinco continentes (Moreira *et al.*, J. Applied Microbiol. 114: 605-620, 2013). CYN se aisló por primera 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 produce bloqueo de la síntesis de proteínas en células eucariotas de mamíferos y plantas (Terao *et al.*, Toxicol. 32: 833-843, 1994; Frosio *et al.*, Toxicol. 51: 191-198, 2008), genotoxicidad por fragmentación del ADN (Bazin *et al.*, Environ. Molec. Mutag. 51: 251-259, 2009; Zegura *et al.*, Toxicol. 58: 471-479, 2011; Zegura *et al.*, Mutat. Res. 727: 16-41, 2011) y que disminuye los contenidos de Glutathion (GSH) debido a una disminución de su síntesis a través de la formación de metabolitos vía CYP450 (Runnegar *et al.*, Biochem. Pharmacol. 49: 219-225, 1995) más que a un aumento de su consumo por fenómenos de conjugación a través de la enzima Glutathion S transferasa (GST). La disminución de GSH no parece conllevar a un incremento del estrés oxidativo en la célula (Humpage *et al.*, J. Toxicol. Environ. Health Part A 68: 739-753, 2005) por lo que se sugirió que no era un mecanismo primario de toxicidad de CYN. Sin embargo, recientemente, se ha comprobado la participación directa del estrés oxidativo en la patogénesis de CYN en peces expuestos de forma aguda (Gutierrez-Praena *et al.*, Aquat. Tox. 105:100-106, 2011; Puerto *et al.*, Ecotoxicology, 20:1852-1860, 2011) y subcrónica (Guzmán-Guillén *et al.*, Chemosphere, 90:1184-1194, 2013)

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 (Gutierrez-Praena D. *et al.*, *Aquat. Toxicol.* 31: 1-8, 2012; P201101162, Cameán Fernández A. *et al.*, 2011) y L-carnitina (Guzmán-Guillén *et al.*, 132-133: 141-150, *Aquat. Toxicol.*, 2013; solicitud de patente Nº P201201151, Cameán Fernández A, *et al.*, 2012) han demostrado actividad protectora en peces frente a la intoxicación por 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 las especies afectadas.

#### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende vit E 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), disminución de los niveles de GSH, y alteración de la actividades enzimáticas antioxidantes Glutación-s-transferasa (GST) y Glutación peroxidasa (GPx) 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, corazón, tracto gastrointestinal, branquias y cerebro.

La vitamina E 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 vit E como aditivo alimentario no sólo mejora los niveles de GSH en hígado, sino que por su propia actividad antioxidante es capaz de disminuir la lipoperoxidación (LPO) (hígado, riñón), recuperar las alteraciones de las actividades enzimáticas antioxidantes Glutación-s-transferasa (GST) (hígado, riñón) y Glutación peroxidasa (GPx) (hígado) inducida por CYN, y prevenir y recuperar las lesiones  
10 histopatológicas inducidas en múltiples órganos como hígado, riñón, corazón, tracto gastrointestinal, branquias y cerebro.

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

La composición de la presente invención comprende, al menos, vit E. El medicamento está compuesto, al menos, por la composición anterior. La vit E, sus sales, derivados farmacéuticamente aceptables o sus profármacos, se formulan en una composición  
20 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,  
25 farmacéuticamente aceptable o cualquier otro compuesto que después de su administración, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) vit E.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la  
30 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 vit E. 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 siete 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 vitamina E 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, tracto gastrointestinal, branquias o cerebro. 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

10 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.

15

En otra realización más preferida de la presente invención, la vit E se administra en una cantidad diaria de 700 mg por Kg de peso del pez. Esta administración se lleva a cabo durante al menos siete días.

20

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.

25

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

30

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, vit E), 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  
5 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.

10 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  
15 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  
20 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.

25 La vitamina E 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  
30 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.*

10

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

25

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.

30

35

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

**Figura 1: Muestra el efecto protector de la vit E sobre la LPO en hígado y riñón de tilapias expuestas a 400 µg CYN/kg pez.**

- 5 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).
- 10 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: (\*) grupo de peces expuestos a CYN con respecto a su grupo control y (#) grupo de peces expuestos a CYN y pretratados con vit E (700 mg/Kg pez/día) versus grupo no pretratado con vit E.
- 15

**Figura 2. Muestra el efecto protector de la vit E, aumentando el cociente GSH/GSSG en hígado de peces intoxicados con 400 µg CYN/kg pez.**

- Medidas del cociente Glutati3n reducido/glutati3n oxidado (GSH/GSSG).
- 20 Donde: el eje Y representa los valores de GSH/GSSG (n=8). Los niveles de significaci3n, 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: (\*) grupo de peces expuestos a CYN con respecto a su grupo control y (#) grupo de peces expuestos a CYN y pretratados con vit E (700 mg/Kg pez/día) versus grupo no pretratado con vit E.
- 25

**Figura 3. Muestra el efecto protector de la vit E, recuperando la actividad normal de la enzima antioxidante GST en hígado y riñón de peces intoxicados con 400 µg CYN/kg pez.**

- 30 Medidas de la actividad enzimática antioxidante Glutati3n-s-transferasa (GST).  
Donde: el eje Y representa los valores de GST expresados en nkat/ mg de proteína ± error estándar (n=8). Los niveles de significaci3n, 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: (\*) grupo de peces expuestos a CYN con respecto a su grupo control y (#) grupo de peces expuestos a CYN y pretratados con vit E (700 mg/Kg pez/día) versus grupo no pretratado con vit E.

5

**Figura 4. Muestra el efecto protector de la vit E, recuperando la actividad normal de la enzima antioxidante GPx en hígado de peces intoxicados con 400 µg CYN/kg pez.**

Medidas de la actividad enzimática antioxidante glutatión peroxidasa (GPx).

10 Donde: el eje Y representa los valores de GPx expresados en nkat/ mg de proteína  $\pm$  error estándar (n=8). El nivel de significación ( $p < 0.05$ ) es (\*) grupo de peces expuestos a CYN con respecto a su grupo control.

15 **FIG. 5. Muestra los cambios histopatológicos en hígado de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por vit E.**

A, C, E, G: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 100 µm. B, D, B, D, F, H: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10 µm.

20 **FIG. 6. Cambios histopatológicos en riñón de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por vit E.**

A, C, E, G: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 100 µm. B, D, B, D, F, H: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10 µm.

25 **FIG. 7. Cambios histopatológicos en corazón de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por vit E.**

A, C, E, G: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 100 µm. B, D, B, D, F, H: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10 µm.

30 **FIG. 8. Cambios histopatológicos en intestino de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por vit E.**

A, C, E, G: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 100 µm. B, D, B, D, F, H: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10 µm.

**FIG. 9: Cambios histopatológicos en branquias de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por vit E observados con el microscopio óptico y electrónico de barrido.**

5 A, C, E, G: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 100  $\mu\text{m}$ . B, D, B, D, F, H: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10  $\mu\text{m}$ .

**FIG. 10: Cambios histopatológicos en cerebro de tilapias expuestas a CYN y su recuperación por vit E observados con el microscopio óptico y electrónico de barrido.**

10 A, C, E, G: Tinción con Hematoxilina-eosina. Las barras miden 100  $\mu\text{m}$ . B, D, B, D, F, H: Observaciones ultraestructurales. Las barras miden 10  $\mu\text{m}$ .

### **EJEMPLOS**

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

### **EJEMPLO 1**

20 La invención se llevó a cabo empleando un total de 32 peces macho de *Oreochromis sp.* (Nile tilapia, Perciformes, Cichlidae), de peso medio  $55,2 \pm 6,7$  g y longitud de  $12 \pm 2$  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, Spain), en una cantidad de 0,3 g/día. Los peces se aclimataron durante 25 días antes del experimento. Se realizaron 4 grupos experimentales (8 animales cada uno). Los peces fueron intoxicados con 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  pez de la toxina CYN procedente de un estándar puro (pureza > 95%, Alexis Corporation, Lausen, Suiza) por vía oral (mezclado junto con el pienso). La administración de vit E se realizó también a través del pienso durante un pretratamiento de 7 días, empleando dosis 30 de 700 mg vit E/pez/día siguiendo el siguiente esquema:

**Acuario 1:** peces control, alimentados solo con pienso normal durante 7 días

**Acuario 2:** peces alimentados con pienso durante 7 días e intoxicados con CYN (dosis única de 400  $\mu\text{g}$  CYN/kg pez) procedente de estándar puro.

**Acuario 3:** peces alimentados con pienso + vit E (700 mg/Kg pez/día) durante 7 días.

5 **Acuario 4:** peces alimentados con pienso + vit E (700 mg/Kg pez/día) durante 7 días e intoxicados con CYN (dosis única de 400 µg CYN/kg pez) procedente de estándar puro.

Al final del experimento, a las 24 h de la administración de CYN, los peces fueron sacrificados mediante anestesia 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; se determinó el cociente glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) mediante un kit comercial según indicaciones (Bioxytech GSH/GSSH-412, Oxis Research, Foster City, CA, USA) y las actividades enzimáticas glutatión s transferasa (GST) y glutatión peroxidasa (GPx) (Habig *et al.*, J. Biol. Chem. 249: 7130-7139, 1974; Lawrence and Burk, Bioch. Bioph. Res. Com. 71: 952-958.1976) 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). Para los estudios de significación estadística entre grupos se empleo el análisis de la varianza (ANOVA) y posteriormente el ensayo de Tukey, con una significación estadística  $p < 0,05$ .

25 Los resultados más significativos fueron los siguientes:

1) En la **Figura 1** se observa como CYN incrementa la LPO en hígado y en riñón (1,3 veces en ambos órganos) frente al control, y los efectos protectores de vit E volviendo este parámetro a los valores basales.

30 2) En la **Figura 2** se observa como CYN disminuye el cociente GSH/GSSG en hígado (2 veces) y que la aplicación de vit E mejoró este parámetro devolviendo este cociente hasta los valores control.

3) En la **Figura 3** se observa como CYN produce una disminución de la actividad enzimática GST en hígado (2.2 veces) y riñón (1.6 veces) y que la aplicación de vit E recuperó este parámetro hasta los valores control.

5 4) En la **Figura 4** se observa como CYN produce un incremento de la actividad enzimática GPx en hígado (1.2) y que la aplicación de vit E recuperó este parámetro hasta los valores control.

**EJEMPLO 2. Vit E mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en hígado.**

10

El estudio histopatológico del hígado de los peces pertenecientes a los lotes tratados con CYN puso en evidencia un proceso degenerativo hepático evidenciado por presencia de glucógeno y pérdida de la estructura hepática (FIG. 5 E, F), frente a una ausencia de lesiones del grupo control (FIG. 5 A, B) caracterizada por cordones hepáticos normales, con hepatocitos con una morfología poliédrica normal.

15

En los dos lotes de peces tratados exclusivamente con vit E se observó que no existían lesiones hepáticas presentando una morfología aparentemente normal (FIG. 5 C, D). En los lotes de peces a los que junto a la toxina CYN se les administró 700 mg vit E/kg pez/día presentan un parénquima hepático con una morfología aparentemente normal con escasa presencia de glucógeno que no llega a ser un proceso patológico (FIG. 5 G, H).

20

**A, B:** Hígado de pez control. **A:** Cordones hepáticos normales, morfología poliédrica con núcleo central y citoplasma claro **B:** Detalle de hepatocito aparentemente normal, con abundantes orgánoides citoplasmáticos, retículos y mitocondrias.

25

**C, D:** Hígado de pez control tratado con vitamina E. **C:** Parénquima hepático aparentemente normal con hepatocitos en cordones bien estructurados **D:** Detalle de hepatocito con morfología aparentemente normal.

30

**E, F:** Hígado de pez tratado con 400 µg de CYN. **E:** Hepatocitos con citoplasma muy claro, núcleo central con membrana celular de aspecto rígido todo ello debido

al gran contenido de glucógeno (círculo) **F**: Detalle del hepatocito con alto contenido de glucógeno y escasos organoides (círculos).

**G, H**: Hígado de pez pretratado con 700 mg de vit E y tratado con 400 µg CYN. **G**: Detalle de parénquima hepático con cordones hepáticos de estructura aparentemente normal **H**: Hepatocitos con núcleos centrales rodeados de escaso contenido de glucógeno (círculos).

**EJEMPLO 3. Vit E mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en riñón.**

Morfológicamente los riñones de los peces de los lotes tratados con CYN mostraron glomerulopatía, hemorragias, tumefacción tubular, dilatación de los túbulos contorneados proximales (TCP) y desorganización de los túbulos contorneados distales (TCD) (FIG. 6 E, F). Los riñones de los peces del lote control presentaron una estructura aparentemente normal (FIG. 6 A, B).

El estudio de los peces tratados solamente con 700 mg vit E/Kg pez/día no mostró ninguna lesión renal (FIG. 6 C, D).

En los peces a los que se les administró CYN pura junto con vit E se observó estructuralmente y ultraestructuralmente una morfología del parénquima renal totalmente normal (FIG. 6 G, H).

**A, B**: Riñón de pez control. **A**: Parénquima renal donde su estructura es aparentemente normal. Glomérulos (círculo), túbulos contorneados proximales (TCP) y túbulos contorneados distales (TCD) aparentemente normales **B**: Detalle de podocitos aparentemente normales (Po).

**C, D**: Riñón de pez control tratado con vitamina E. **C**: Detalle de parénquima renal con glomérulos (círculo) y túbulos contorneados (TCP, TCD) aparentemente normales **D**: Detalle de glomérulo renal con los pedicelos (Pe) de los podocitos aparentemente normales.

**E, F**: Riñón de pez tratado con 400 µg de CYN. **E**: Detalle de parénquima renal con glomérulos donde existe un aumento de las células (círculo) y presencia de

hemorragias (flecha). Túbulos contorneados proximales dilatados (TCP) y túbulos contorneados distales (TCD) desorganizados F: Glomérulo renal con aumento de la densidad electrónica de los pedicelos muy manifiesta (Pe).

5 **G, H:** Riñón de pez pretratado con 700 mg de vit E y tratado con 400 µg CYN. **G:** Glomérulos renales (círculo) y túbulos contorneados (TCP, TCD) aparentemente normales **H:** Detalle de glomérulo renal con pedicelos (Pe) aparentemente normales.

10 **EJEMPLO 4. Vit E mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en corazón.**

El estudio histopatológico realizado sobre peces tratados con CYN mostraron al microscopio óptico presencia de edemas y microhemorragias (FIG. 7 E). Al microscopio electrónico se observa una degeneración de las miofibrillas y presencia de edema intracelular (FIG. 7 F). El corazón de los peces del lote control presentó una estructura aparentemente normal (FIG. 7 A, B).

Los peces tratados solo con vit E presentan una morfología de las fibras cardiacas aparentemente normal y similares a las del grupo control (FIG. 7 C, D).

20 No se observaron lesiones en los peces tratados con 700 mg vit E/Kg pez/día y expuestos a CYN, observándose miofibrillas aparentemente normales (FIG. 7 G, H).

25 **A, B:** Corazón de pez control. **A:** Detalle de fibras cardiacas aparentemente normales **B:** Miofibrillas aparentemente normales con evidencia de las bandas escaleriformes formadas por desmosomas (círculo).

**C, D:** Corazón de pez control tratado con vitamina E. **C:** Fibras cardiacas aparentemente normales (círculo). **D.** Detalle de miofibrillas aparentemente normales (círculo).

30 **E, F:** Corazón de pez tratado con 400 µg de CYN. **E:** Fibras cardiacas desorganizadas (círculo) con presencia de edemas (estrellas) y microhemorragias (flecha) **F:** Detalle de miofibrillas degeneradas (círculo) y presencia de edema intracelular (estrella).

**G, H:** Corazón de pez pretratado con 700 mg de vit E y tratado con 400 µg CYN. **G:** Detalle del parénquima cardíaco aparentemente normal con presencia de ligeros edemas (estrella) **H:** Detalle de miofibrillas aparentemente normales.

5 **EJEMPLO 5. Vit E mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en intestino.**

A nivel de intestino en los peces tratados con CYN se observaron procesos de enteritis con enterocitos necróticos, abundantes células caliciformes y desorganización de microvellosidades (FIG. 8 E, F) en comparación con el grupo control (FIG. 8 A, B).

Tras la administración de la vit E se observaron células caliciformes y enterocitos con abundantes mitocondrias y microvellosidades aparentemente normales (FIG. 8 C, D), al igual que en los grupos de peces a los que se les administró vit E junto con CYN (FIG. 8 G, H), mostrando así la vit E un efecto protector frente a la toxina.

15

**A, B:** Intestino de pez control. **A:** Vellosidades aparentemente normales **B:** Enterocitos con microvellosidades muy desarrolladas y aparentemente normales.

**C, D:** Intestino de pez control tratado con vitamina E. **C:** Mucosa intestinal con vellosidades y células caliciformes aparentemente normales **D.** Enterocitos con abundantes mitocondrias (Mi) y abundantes microvellosidades (círculo).

20

**E, F:** Intestino de pez tratado con 400 µg de CYN. **E:** Mucosa intestinal con abundantes enterocitos necróticos (flechas) y abundantes células caliciformes (círculo) **F:** Detalle de enterocitos con microvellosidades desorganizadas (círculo) y presencia de abundantes células caliciformes (Cc).

**G, H:** Intestino de pez pretratado con 700 mg de vit E y tratado con 400 µg CYN. **G:** Detalle de microvellosidades intestinales aparentemente normales y escasas células caliciformes (círculo) **H:** Detalle de enterocitos con abundantes microvellosidades aparentemente normales (círculo).

25  
30

**EJEMPLO 6. Vit E mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en branquias.**

Al microscopio óptico las branquias de los peces tratados con CYN pura presentaron procesos hiperémicos en las lamelas del arco branquial con fusión de las mismas y presencia de infiltrados de células inflamatorias (FIG. 9 E). Al microscopio electrónico se observaron una desorganización de la pared de las lamelas branquiales con infiltrados inflamatorios (FIG. 9 F).

Estas lesiones no fueron observadas en el lote control (FIG. 9 A, B), ni en los peces tratados con vit E (FIG. 9 C, D), ni en los grupos de a los que se les administró vit E junto con CYN (FIG. 9 G, H), que presentaron una morfología de branquias y lamelas aparentemente normales. Se muestra así el efecto protector de la vit E frente a CYN.

**A, B:** Branquia de pez control. **A:** Detalle de branquias aparentemente normales **B:** Estructura de las lamelas aparente normales.

**C, D:** Branquias de pez control tratado con vitamina E. **C:** Detalle de branquias aparentemente normales **D:** Estructura de las lamelas aparente normales.

**E, F:** Branquias de pez control tratado con 400 µg de CYN. **E:** Lamelas del arco branquial con fuertes procesos hiperémicos (flechas), fusión de las lamelas (círculo) y con infiltrado de células inflamatorias (estrella) **F:** Desorganización de la pared de las lamelas branquiales con acumulo de células inflamatorias (círculo).

**G, H:** Branquias de pez pretratado con 700 mg de vit E y tratado con 400 µg CYN. **G.** Detalle de lamelas aparentemente normales. **H.** Detalle de las lamelas aparentemente normales.

**EJEMPLO 7. Vit E mejoró las alteraciones histopatológicas inducidas por CYN en cerebro.**

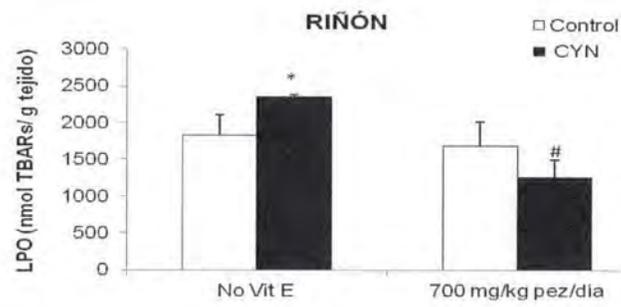
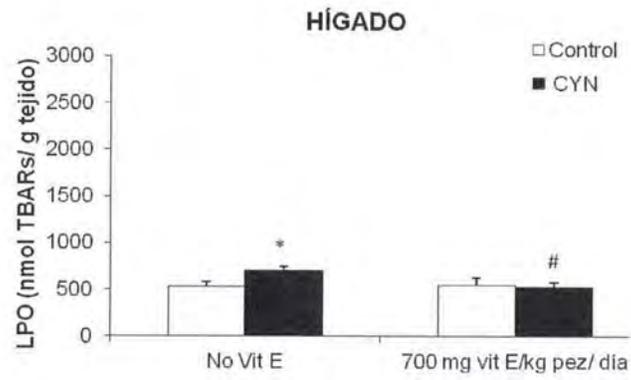
A nivel de sistema nervioso (cerebro) en los peces tratados con CYN se observa un proceso necrótico y degenerativo de las neuronas caracterizado por presencia de neuronas tumefactas con cierto grado de vacuolización, núcleo denso e irregular (FIG. 10 E, F) en comparación con el grupo control (FIG. 10 A, B) y con el grupo tratado exclusivamente con vit E (FIG. 10 C, D).

Tras la administración de la vit E junto con CYN se observaron las neuronas aparentemente normales mostrando así el efecto protector de la vit E frente a la toxina. (FIG. 10 G, H).

- 5     **A, B:** Cerebro de pez control. **A.** Detalle de neuronas piramidales **B.** Detalle de neurona aparentemente normal con gran cantidad de organoides citoplasmáticos.
- C, D:** Cerebro de pez control tratado con vitamina E. **C.** Detalle de la capa de neuronas granulares aparentemente normales (círculo) **D.** Detalle de neurona aparentemente normal.
- 10    **E, F:** Cerebro de pez control tratado con 400 µg de CYN. **E.** Neuronas degeneradas tumefactas muy basófilas y con cierto grado de vacuolización (círculo) **F.** Detalle de neurona con núcleo muy denso e irregular (Nu) y con todos los organoides membranosos vacuolizados (flechas).
- G, H:** Cerebro de pez pretratado con 700 mg de vit E y tratado con 400 µg CYN. **G.**
- 15    Neuronas aparentemente normales **H.** Detalle de neurona aparentemente normal.

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Uso de una composición que comprende vitamina E 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 vitamina E 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.
- 15
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, tracto gastrointestinal, branquias o cerebro.
- 20
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la vitamina E se administra en una cantidad diaria de 700 mg/Kg pez/día.
6. Uso según la reivindicación 5, donde la composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral o intraperitoneal.
- 25
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.
- 30
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la fabricación de un alimento funcional.
- 35
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.
- 40
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde los peces son cultivados.
- 45
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde los peces pertenecen al género *Oreochromis sp.*



**FIG. 1**

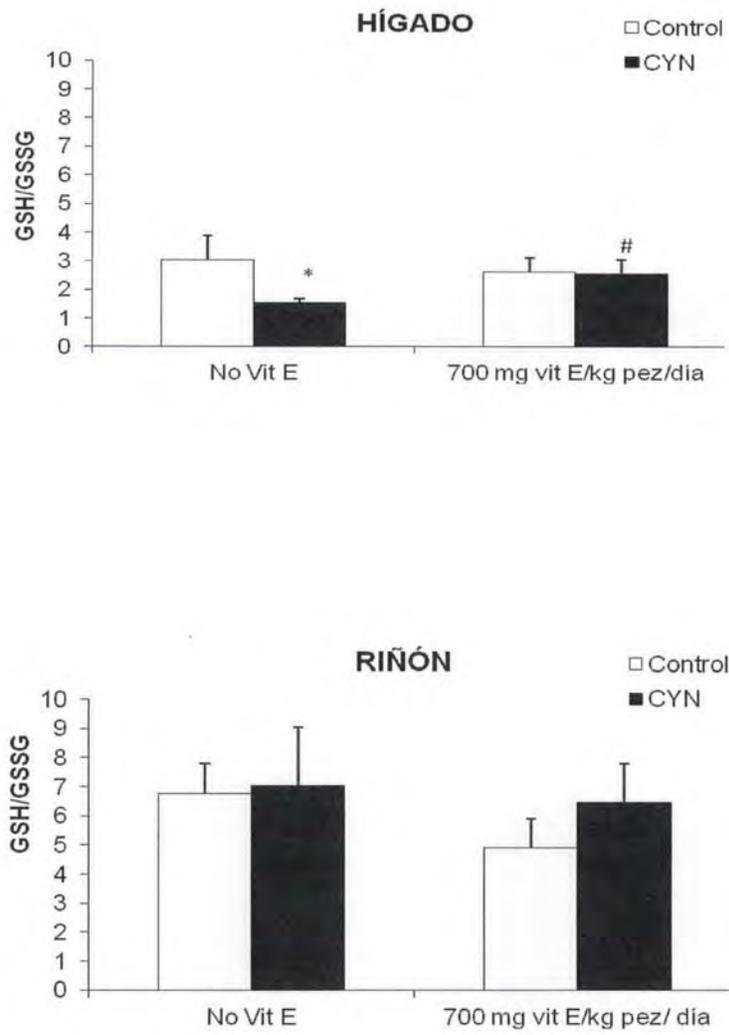
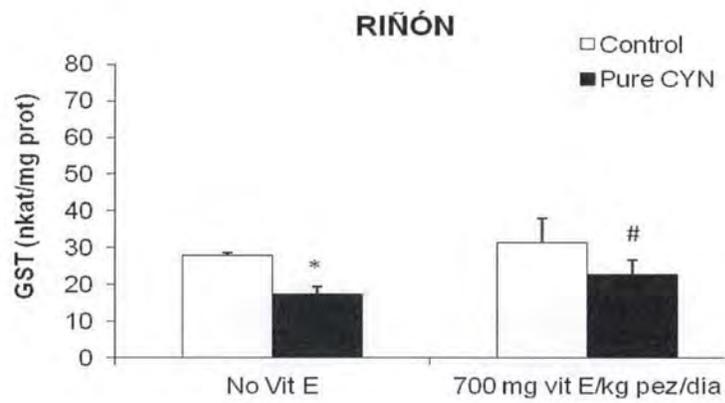
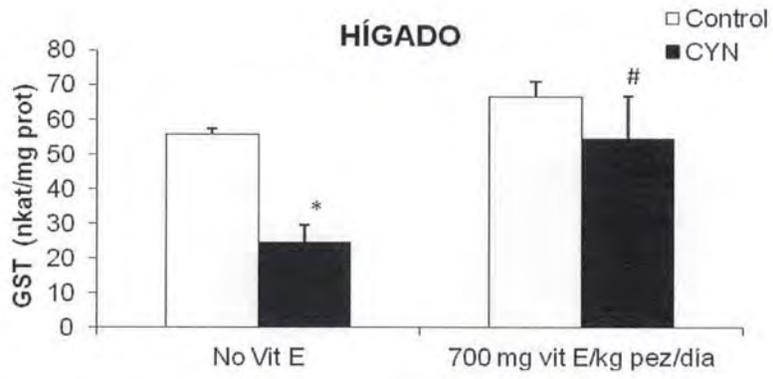
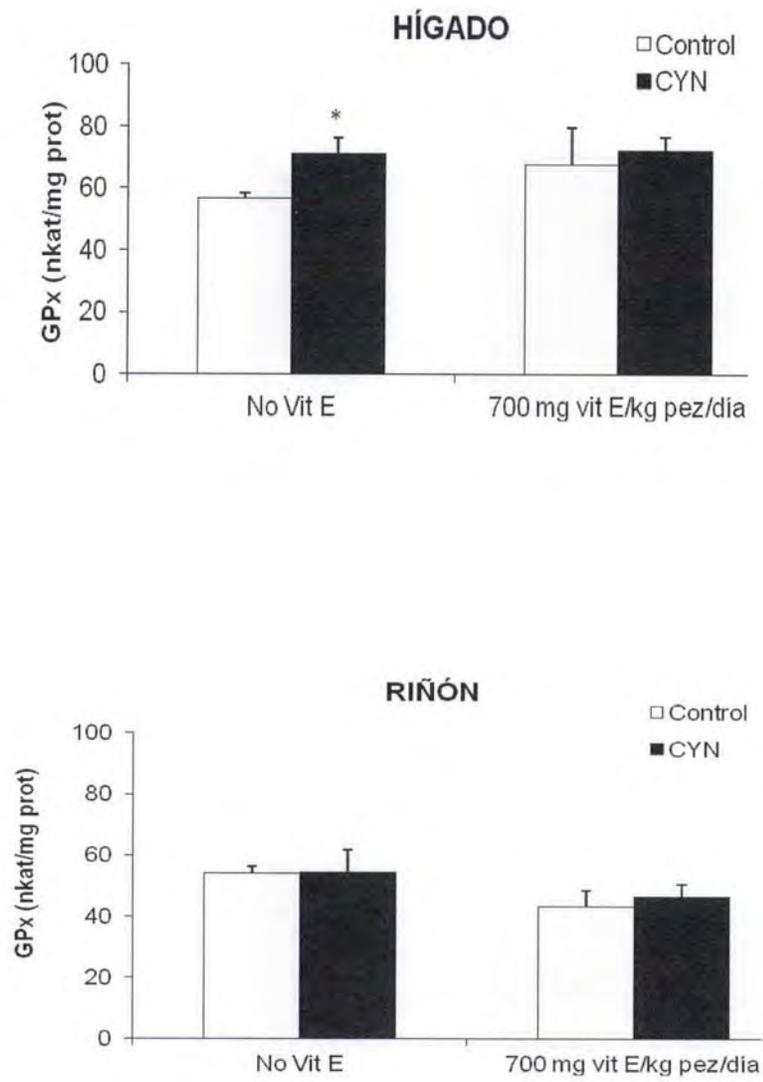


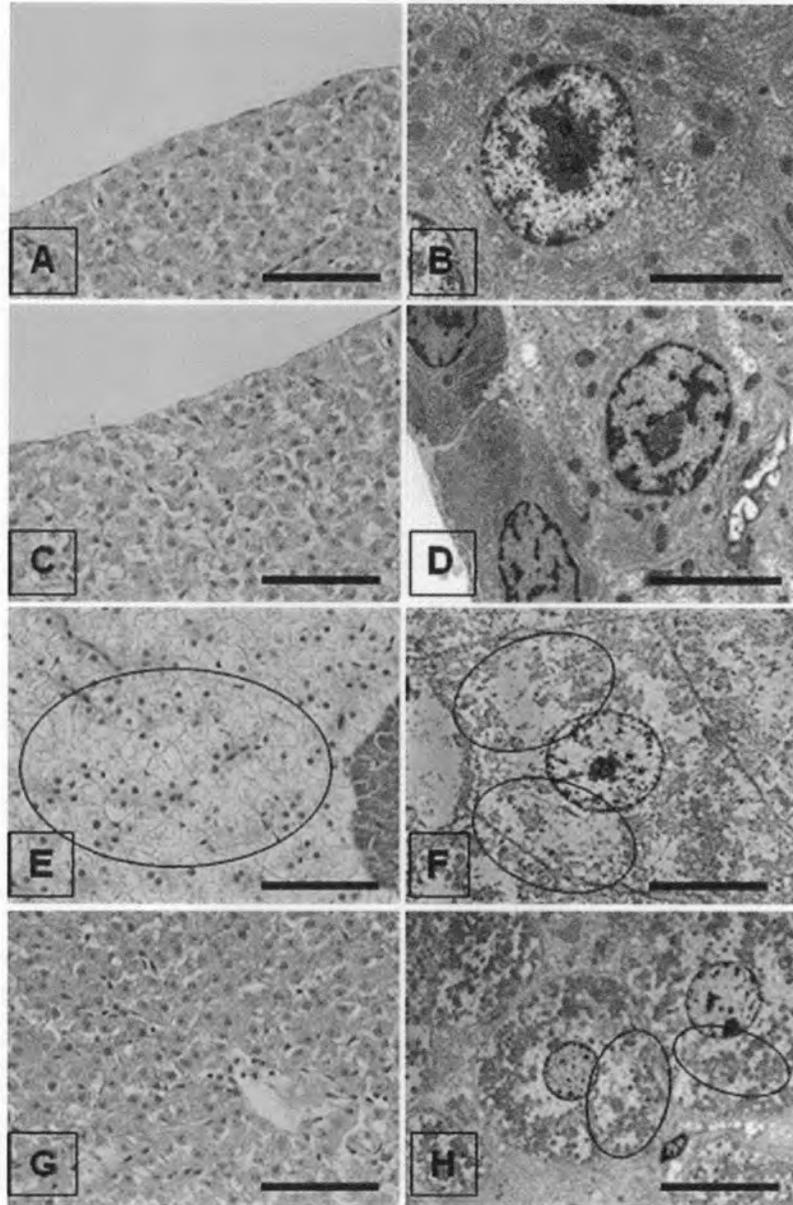
FIG. 2



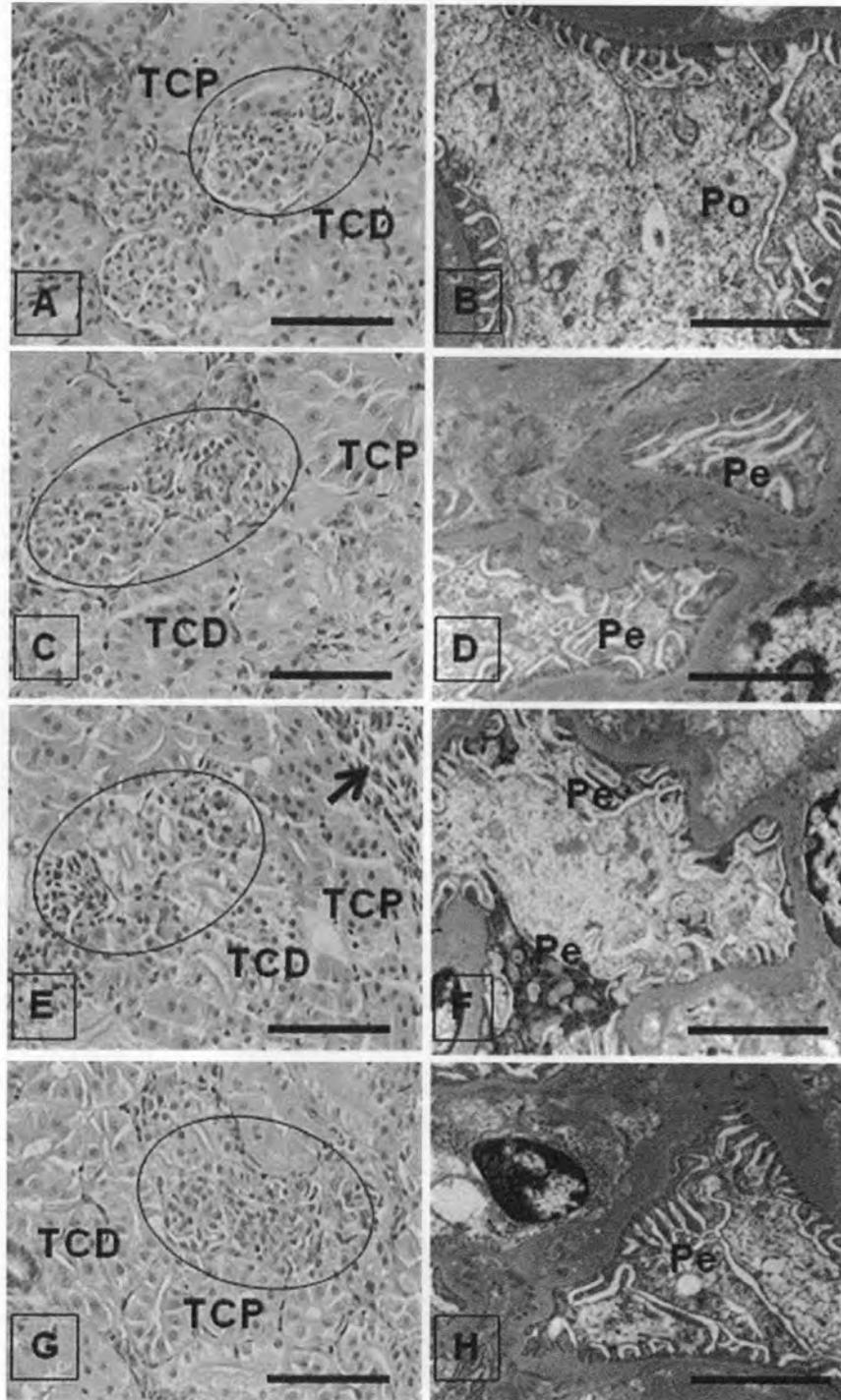
**FIG. 3**



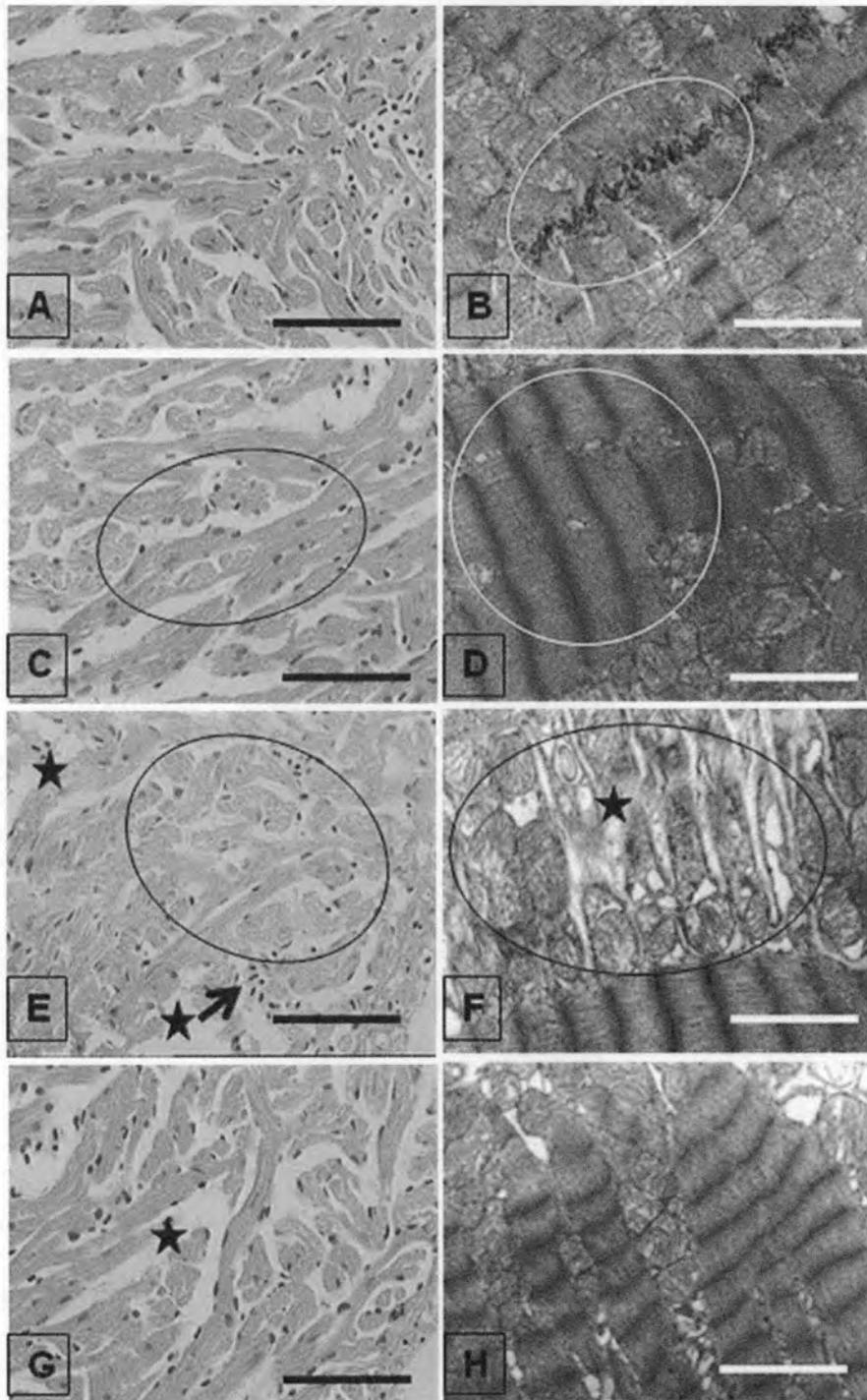
**FIG. 4**



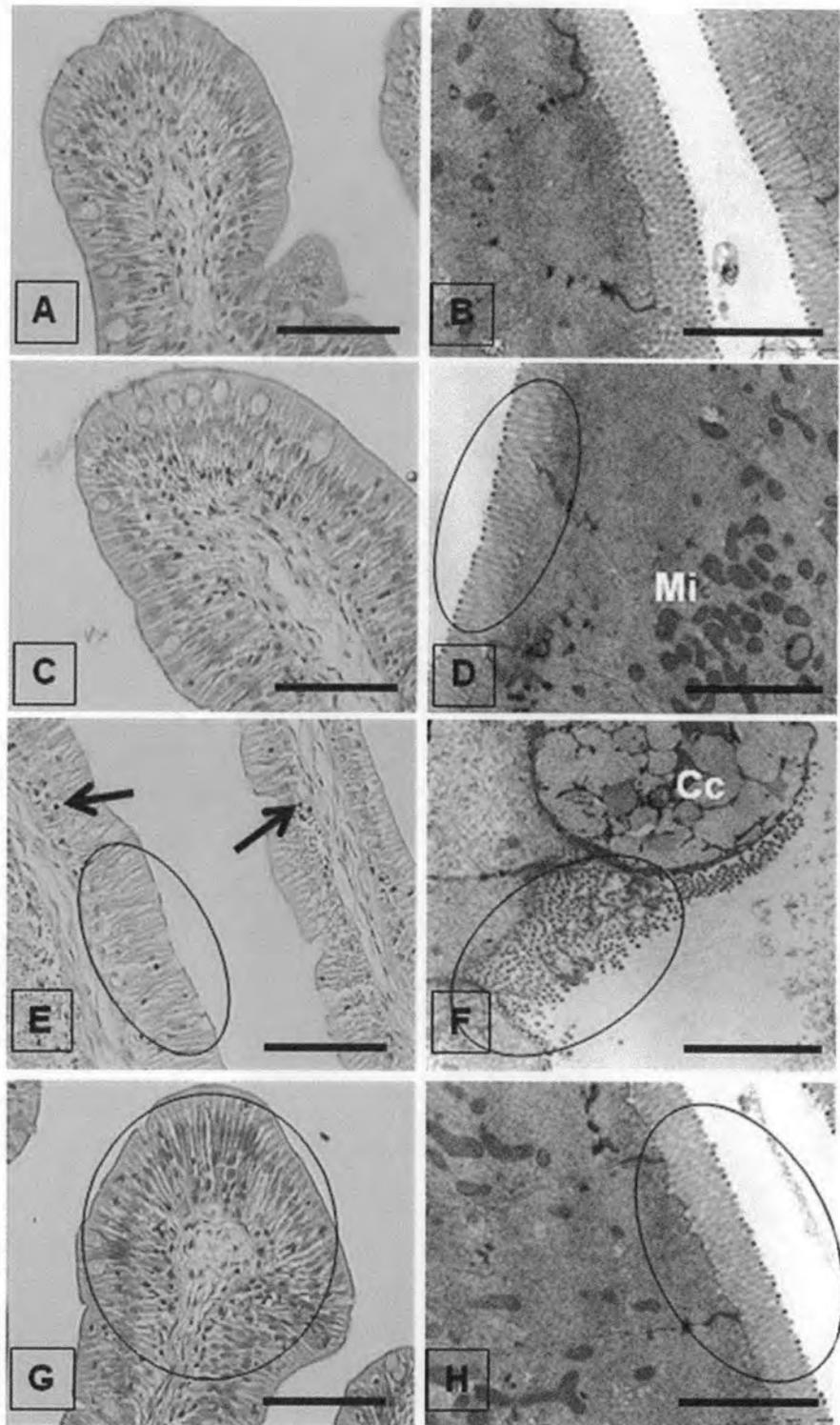
**FIG. 5**



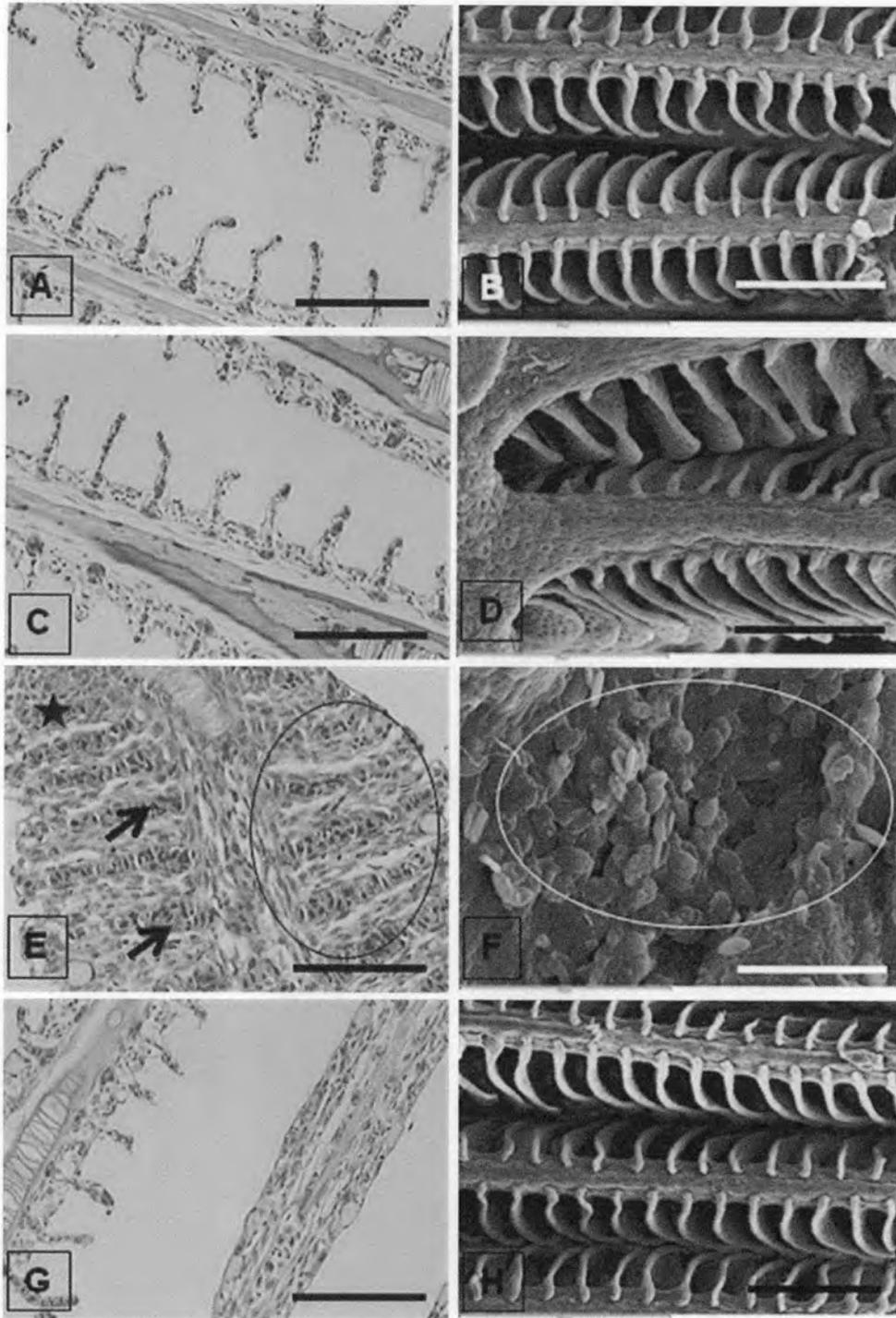
**FIG. 6**



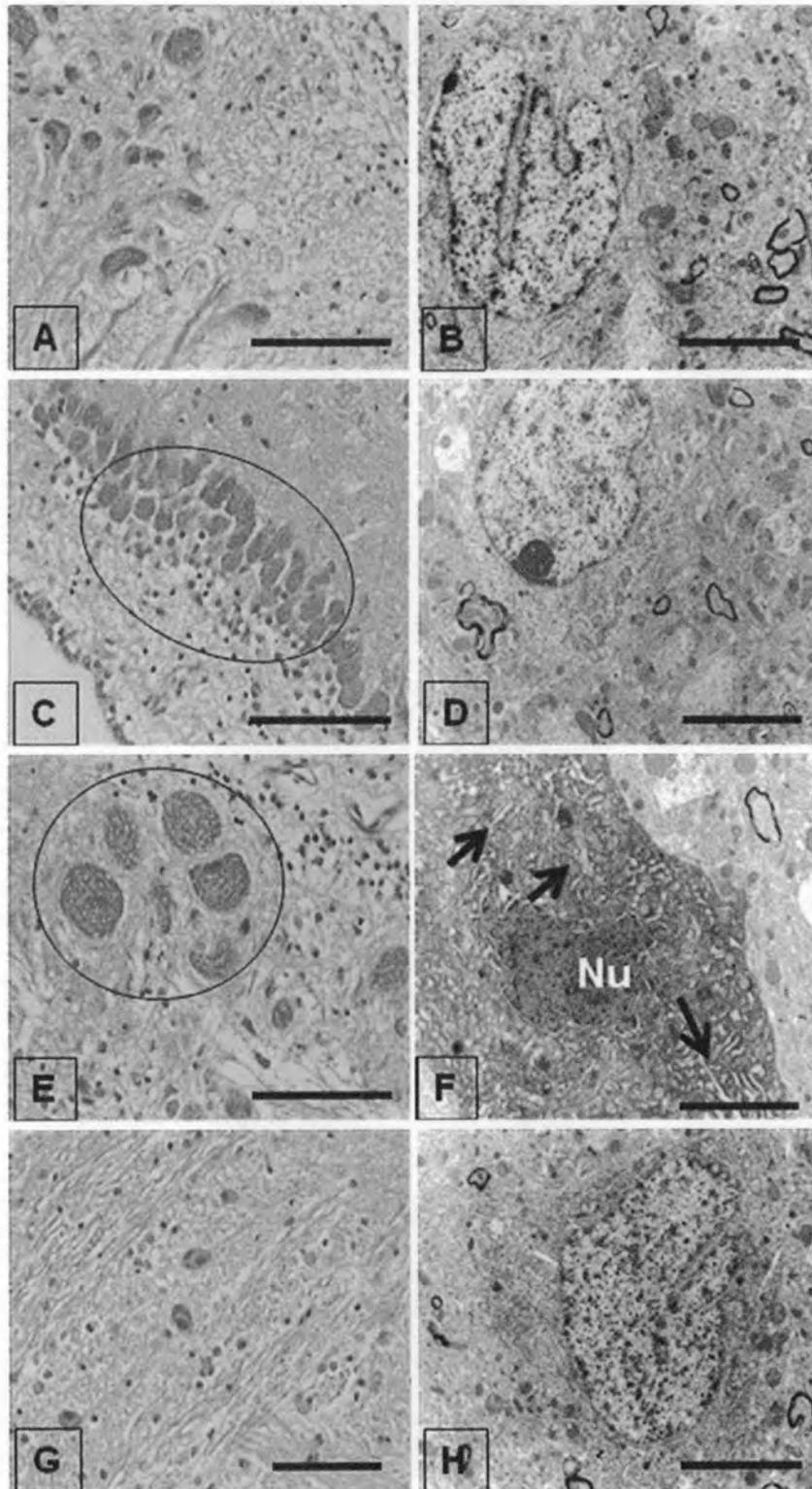
**FIG. 7**



**FIG. 8**



**FIG. 9**



**FIG. 10**



- ②① N.º solicitud: 201400428  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.05.2014  
 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
Y	ES 2402477 A1 (UNIV SEVILLA et al.) 06.05.2013, todo el documento.	1-13
Y	ES 2460391 A1 (UNIV SEVILLA et al.) 13.05.2014, todo el documento.	1-13
Y	PRIETO, A.I. et al. Protective role of vitamin E on the microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Environmental toxicology and chemistry, 2008, vol, 27 (5), páginas 1152-1159.	1-13
Y	EL-SHEBLY, A. Protección of nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) from lead pollution and enhancement of its growth bu alfa-tocopherol vitamin E. Research Journal of Fisheries and Hydrobiology, 2009, vol 4 (1), páginas 17-21.	1-13
Y	HASSAAN, M. et al. Protective effect of dietary vitamin E against fungicide copperoxychloride stress on nile tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i> (L.) fingerlings. International Aquatic Research. 22.03.2014. vol 6 (1). Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 16.11.2014] < <a href="http://www.intaquares.com/content/pdf/2008-6970-6-1.pdf">http://www.intaquares.com/content/pdf/2008-6970-6-1.pdf</a> >	1-13
A	ES 2152039 T3 (BAENSCH TETRA WERKE TETRA GMBH) 16.01.2001, todo el documento.	1-13
A	WO 03013268 A1 (MARS UK LTD et al.) 20.02.2003, todo el documento.	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  
16.12.2014

Examinador  
A. I. Polo Diez

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K31/355** (2006.01)

**A23K1/18** (2006.01)

**A23K1/16** (2006.01)

**A61P39/06** (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, HCAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, BD-TXTE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.12.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-13	<b>NO</b>

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	ES 2402477 A1 (UNIV SEVILLA et al.)	06.05.2013
D02	ES 2460391 A1 (UNIV SEVILLA et al.)	13.05.2014
D03	PRIETO, A.I. et al. Protective role of vitamin E on the microcystin-induced oxidative stress in tilapia fish ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) <i>Environmental toxicology and chemistry</i> , 2008, vol, 27 (5), páginas 1152-1159.	
D04	EL-SHEBLY, A. Protección de nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) from lead pollution and enhancement of its growth by alpha-tocopherol vitamin E. <i>Research Journal of Fisheries and Hydrobiology</i> , 2009, vol 4 (1), páginas 17-21.	
D05	HASSAAN, M. et al. Protective effect of dietary vitamin E against fungicide copperoxychloride stress on nile tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i> (L.) fingerlings. <i>International Aquatic Research</i> . 22.03.2014. vol 6 (1). Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 16.11.2014] < <a href="http://www.intaquares.com/content/pdf/2008-6970-6-1.pdf">http://www.intaquares.com/content/pdf/2008-6970-6-1.pdf</a> >	
D06	ES 2152039 T3 (BAENSCH TETRA WERKE TETRA GMBH)	16.01.2001
D07	WO 03013268 A1 (MARS UK LTD et al.)	20.02.2003

**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**

El objeto de la invención es el uso de una composición que contiene vitamina E en la elaboración de un medicamento útil para el tratamiento, prevención y recuperación de los efectos tóxicos en peces expuestos a cilindrospermopsina (reivindicaciones independientes 1 y 2)

Las reivindicaciones dependientes 3 a 13 se refieren a detalles del uso como la cantidad administrada, la vía de administración, el tipo de pez, etc.

Novedad (art 6.1 de la L.P)

Ningún documento del estado de la técnica divulga el uso de la vitamina E en un medicamento para tratar, prevenir o recuperar a los peces de los efectos tóxicos que produce la cilindrospermopsina, por lo que se considera que las reivindicaciones independientes 1 y 2 y todas las reivindicaciones dependientes cumplen el requisito de novedad.

Actividad inventiva (art. 8 de la L.P.)

Los documentos D1 y D2 se refieren a la utilización de dos medicamentos para el tratamiento, prevención y recuperación de los efectos tóxicos que produce la intoxicación con cilindrospermopsina en peces. En estos documentos se pone de manifiesto que la cilindrospermopsina, toxina producida por algunas cianobacterias, produce en los peces estrés oxidativo. Los dos medicamentos utilizados (la N-acetilcisteína y la L-carnitina) actúan como antioxidantes disminuyendo el estrés oxidativo (disminuyen los niveles de GSH y la lipooxidación). Cada uno de estos documentos se puede considerar como el documento más cercano del estado de la técnica puesto que se divulgan el mecanismo de intoxicación de la cilindrospermopsina y la utilización de dos productos para el tratamiento de dicha intoxicación.

La diferencia entre la primera reivindicación de la solicitud y cada uno de los documentos más cercanos del estado de la técnica (D1 y D2) es la utilización de otro producto para el tratamiento y la prevención de la intoxicación con cilindrospermopsina.

Así pues, el problema a resolver por la solicitud sería encontrar un producto alternativo a los ya existentes para el tratamiento y prevención de la intoxicación con cilindrospermopsina.

Un experto en la materia que buscara una alternativa al tratamiento de la intoxicación con cilindrospermopsina y sabiendo que los antioxidantes han tenido éxito en el tratamiento, probaría con otros antioxidantes conocidos y entre todos los posibles, elegiría aquellos que ya han sido utilizados en peces para problemas parecidos.

La vitamina E es un conocido antioxidante que ha sido utilizado en peces para protegerlos del estrés oxidativo producido por variedad de tóxicos de muy diferentes orígenes y características. En el documento D3 se utiliza para la intoxicación con microcistinas (otra toxina producida por cianobacterias), en el documento D4 para la intoxicación con plomo, en el documento D5 para la intoxicación con el fungicida oxiclورو de cobre. Por último, en los documentos D6 y D7 se aconseja el uso de la vitamina E contra el estrés en animales acuáticos y, para reducir el daño del DNA en animales (gatos, perros y peces).

Sería pues obvio para un experto en la materia probar con la vitamina E que ya ha sido utilizada con éxito en peces para tratar otro tipo de intoxicaciones de muy diversa índole.

Se considera, por tanto, que la reivindicación 1 no cumple el requisito de actividad inventiva, en vista de las combinaciones de documentos D1 o D2 con D3 o D4 o D5.

Las reivindicaciones dependientes 3 a 13 no aportan ninguna característica que en combinación con la reivindicación de la que dependen, les otorgue actividad inventiva.

Las reivindicaciones 3 y 4 se refieren a la recuperación de los efectos tóxicos que produce la cilindrospermopsina a nivel histopatológico en los tejidos. Como se ha visto en los documentos D1 y D2, los productos que disminuyen el estrés oxidativo revierten también las alteraciones histológicas de los tejidos afectados por la intoxicación.

Las reivindicaciones 6 a 13 se refieren a los modos de administración y al tipo de peces. Dichos modos y tipo de peces son los mismos que los divulgados en D1 o D2.

En cuanto, a la cantidad de vitamina E empleada, concretada en la reivindicación 5, esa cantidad se encuentra dentro de las dosis habitualmente utilizadas en peces para eliminar el estrés oxidativo. Sería obvio para un experto en la ajustar un valor entre lo habitualmente utilizado a cada tipo de peces o de edades de los peces.

En consecuencia, se considera que ninguna de las reivindicaciones dependientes 3 a 13 cumple el requisito de actividad inventiva.