

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de junio de 2010 (03.06.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/061017 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 33/04 (2006.01) *A23K 1/16* (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/000545

(22) Fecha de presentación internacional:
25 de noviembre de 2009 (25.11.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200803359
26 de noviembre de 2008 (26.11.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; OTRI-Universidad de Sevilla, Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias s/n, E-41013 Sevilla (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **CAMEÁN FERNÁNDEZ, Ana María** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica,

Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES). **ATENCIO GENES, Loyda Esther** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES). **PUERTO RODRÍGUEZ, María** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES). **PRIETO ORTEGA, Ana Isabel** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES). **JOS GALLEGOS, Ángeles Mencía** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES). **MORENO NAVARRO, Isabel** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES). **PICHARDO SÁNCHEZ, Silvia** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF SELENIUM FOR PROTECTING FISH AGAINST MICROCYSTIN POISONING

(54) Título : USO DE SELENIO PARA PROTEGER A LOS PECES DE LA INTOXICACIÓN POR MICROCISTINAS

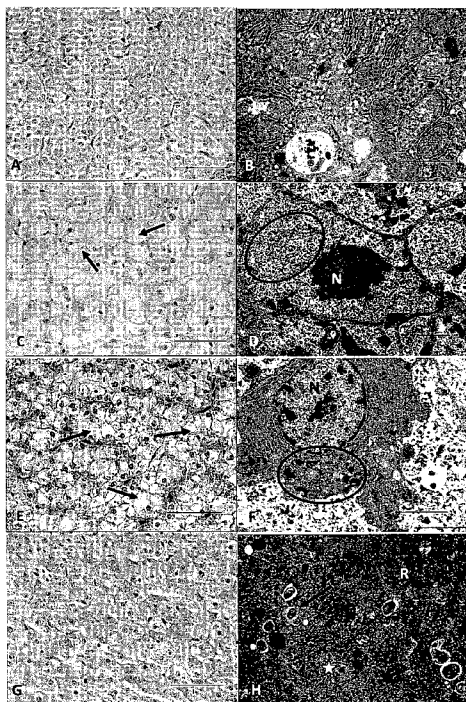


FIG. 1

(57) Abstract: The invention relates to the use of a composition comprising selenium for treating, preventing and/or aiding recovery from toxic effects in fish exposed to microcystins (MCs). The invention also relates to the use of said composition in aiding recovery from adverse histopathological changes that occur in tissue from the list containing: liver, kidney, heart, gills and/or gastrointestinal tract. Furthermore, said composition is used to produce a functional food, a vitamin supplement or a nutritional supplement.

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

WO 2010/061017 A1



MOYANO SALVAGO, M. Rosario [ES/ES]; Dpto. Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES). **BLANCO RODRÍGUEZ, Alfonso** [ES/ES]; Dpto. Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, c/ Profesor García González, 2, E-41012 Sevilla (ES).

- (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM,

TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

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

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

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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

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

metabolismo de hormonas tiroideas y tioredoxina reductasa, involucrada en la síntesis de ADN, defensa frente estrés oxidativo y reparación de proteínas. Su acción protectora antioxidante se ha descrito en el documento WO2006018294-A1, junto con la vitamina E.

5

En peces se ha empleado el selenito sódico como aditivo alimentario en piensos, para mejorar la eficiencia de piensos vegetales (JP61146155-A). El Selenio mejora las defensas antioxidantes fisiológicas en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Miller LL *et al.* (2007) Aquat Toxicol 83:263-271).

10

Asimismo el Selenio se ha utilizado en combinación con cobre para mejorar la respuesta de los animales al estrés oxidativo (Lin Yu-Hung y Shiau Shi-Yen (2007) International Symposium on Fish Nutrition and Feeding 267: 38-43).

15

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

20

25

30

35

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

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

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

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Las MCs son toxinas de estructura heptapeptídica producidas tanto por cianobacterias filamentosas (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Hapalosiphon*) como coloniales (*Microcystis*). Una vez que se ingieren, las MCs se transportan hasta el hígado donde la mayoría quedan almacenadas y el resto permanecen en la sangre y pueden contaminar otros tejidos. Las MCs se unen covalentemente a fosfatasa de proteínas bloqueando así numerosos procesos de control celular. La MC de la presente invención se selecciona de la lista que comprende microcistina LA, microcistina LR, microcistina YR, microcistina RR, microcistina YM, microcistina YA, microcistina LY, microcistina FR, microcistina Laba, microcistina HtyR, microcistina AR, microcistina M(O)R, microcistina WR, 3-desmetilmicrocistina LR, 7-desmetilmicrocistina LR, 3,7-didesmetilmicrocistina LR, 3-desmetilmicrocistina YR, 7-desmetilmicrocistina YR, 3-desmetilmicrocistina RR, 7-desmetilmicrocistina RR, 3,7-didesmetilmicrocistina RR, 3-desmetilmicrocistina HtyR, 7-desmetilmicrocistina HtyR, 3,7-didesmetilmicrocistina HtyR, 7-desmetilmicrocistina HphR, (Mser7)microcistina LR, (Ser7)microcistina LR, (Ser7)microcistina RR, (Ser7)microcistina HtyR, (Ser7)3-desmethytmicrocistina XR, (DMAdda) microcistina LR, (ADMAdda) microcistina LR, (ADMAdda)3-desmetilmicrocistina LR, (ADMAdda) microcistina Lhar, (ADMAdda,Mser7) microcistina LR, D-Glu(CH₃O)estermicrocistina LR, D-

Glu(CH₃O)ester 3-desmetilmicrocistina LR, D-Glu(C₃H₇O₂)ester microcistina LR o (D-Ser1,ADMAAdda) microcistina LR. La lista anterior no se limita a las MCs mencionadas. Preferiblemente la MC es microcistina LR (MC-LR).

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

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

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

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

- Riñón: se recupera la glomerulopatía y atrofia glomerular evidentes, producida por la intoxicación con MCs. Con la administración de selenio se observan glomérulos con los capilares fenestrados aparentemente normales.
- Corazón: Las MCs inducen miofibrosis parcial, edema y microhemorragias, que son superados por la dosis más elevada de selenio (ver más adelante).
- Intestino: El tratamiento con selenio recupera la pérdida, prácticamente total, de microvellosidades producidas por las MCs, apareciendo los enterocitos aparentemente normales y abundantes células calciformes.
- Branquias: Las MCs inducen una hiperemia generalizada, que es revertida por Selenio.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

cualquiera de sus combinaciones pueden administrarse junto con un pienso, formar parte de la composición del pienso o pueden administrarse de forma independiente.

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

En la presente invención se entiende por "peces cultivados" aquellos peces criados en piscifactorías, charcas o cualquier contenedor de agua de cualquier tamaño que permita la cría de peces y/o el engorde. Los peces cultivados
10 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.

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 seleccionan, sin limitar, de la lista que comprende *O. amphimelas*, *O.*
20 *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*
25 *placidus*, *O. placidus ruvumae*, *O. rukwaensis*, *O. saka*, *O. salinicola*, *O. schwebischii*, *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 homorum*, *O. urolepis urolepis* u *O. variabilis*. Más preferiblemente los peces
30 pertenecen a la especie *O. niloticus* (Nile tilapia).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos,
35 ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y

ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

5

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

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

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

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

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

35 (A, B) peces control; (C, D) tilapias expuestas sólo a MCs (120 µgMC/pez.). C. Glomerulopatía y atrofia glomerular evidente (círculo), representado por

una pérdida en el tamaño, hialinizaciones intraglomerulares y pérdida de capilares. D. Glomérulos con engrosamiento y densificaciones de las membranas basales (flechas) y colapsamientos de las luces de los capilares fenestrados (círculo). (E, F) Peces expuestos a MC+Selenio dosis baja (1,5 $\mu\text{g Se/g}$ dieta). E. Glomerulopatía con cierta desorganización interna (rombo), aumento de las células mesangiales (asterisco) y tenue dilatación de la cápsula de Bowman (flecha). F. Capilares fenestrados con la pared del endotelio (1), membrana basal (2) y podocitos (3) prácticamente normal y restos de endotelio tumefacto (círculo). (G, H) Peces expuestos a MC+Selenio dosis media (3,0 $\mu\text{g Se/g}$ dieta). G. Glomérulos prácticamente normales (círculos), algunos con cierta tumefacción de los capilares fenestrados (flecha). H. cierto grado de tumefacción del endotelio capilar (círculo).

FIG. 3. Muestra el efecto protector de diferentes dosis de Selenio (selenito sódico) sobre las lesiones en corazón inducidas por MCs en tilapias expuestas a 120 $\mu\text{g MC/pez}$ (dosis única).

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

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

FIG. 4. Muestra el efecto protector de diferentes dosis de Selenio (selenito sódico) sobre las lesiones en tracto gastrointestinal inducidas por MCs en tilapias expuestas a 120 $\mu\text{g MC/pez}$ (dosis única).

- (A, C, E, G) Tinción Hematoxilina-eosina. Barras 50, 50, 100, 100 μm . (B, D, F, H) Observaciones ultraestructurales (microscopia electrónica). Barras 20, 10, 20, 20 μm
- 5 (A, B) peces control; (C, D) tilapias expuestas sólo a MCs (120 μg MC/pez). C. Acortamiento de las vellosidades intestinales con necrosis en la zona apical (círculo). D. Detalle del epitelio intestinal con núcleos muy densos (N) y pérdida prácticamente total de las microvellosidades (círculo). (E, F) Peces expuestos a MC+Selenio dosis baja (1,5 μg Se/g dieta). E. Vellosidades
- 10 cortas de escasos tamaños, vacuolizaciones citoplasmáticas en enterocitos (círculo). F. Detalle del epitelio con recuperación parcial de las microvellosidades (círculo). (G, H) Peces expuestos a MC+Selenio dosis media (3,0 μg Se/g dieta). G. Vellosidades cortas, células intestinales (enterocitos) con vacuolización y células caliciformes (flecha). H.
- 15 Recuperación parcial de las microvellosidades (círculo).

EJEMPLOS

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

EJEMPLO 1

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

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

Acuario 2: peces alimentados con pienso durante 7 días, intoxicados con MCs en la dieta (dosis única de 120 µg/pez).

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

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

10

Al final del experimento los peces fueron sacrificados, anestesiándolos con hielo, se procedió a la extracción de los órganos, que se fijaron en formol tamponado 10% 24 h a 4° C, y procesados para su estudio al microscopio óptico (etanol, xilol, parafina, y tinción hematoxilina y eosina) y al microscopio electrónico, de acuerdo con Atencio *et al* (2008, Toxicol Pathol 36:449-458). Los resultados más significativos fueron los siguientes:

15

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

20

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

25

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

30

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

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende Selenio para la elaboración de un medicamento útil en el tratamiento y/o prevención de efectos tóxicos en peces expuestos a microcistinas.
5
2. Uso de una composición que comprende Selenio para la elaboración de un medicamento útil en la recuperación de efectos tóxicos en peces expuestos a microcistinas.
10
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde los efectos tóxicos son alteraciones histopatológicas.
4. Uso según la reivindicación 3, donde las alteraciones histopatológicas son producidas en al menos uno de los tejidos de la lista que comprende hígado, riñón, corazón, branquias o tracto gastrointestinal.
15
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el Selenio se administra en una cantidad diaria de entre 400 y 880 mg por Kg de peso del pez.
20
6. Uso según la reivindicación 5, donde la composición se presenta en una forma adaptada a la administración oral o intraperitoneal.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la composición incluye excipientes farmacológicamente aceptables.
25
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.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la fabricación de un complemento vitamínico.
35

11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para la fabricación de un complemento nutricional.
- 5 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde los peces son cultivados.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde los peces pertenecen al género *Oreochromis sp.*

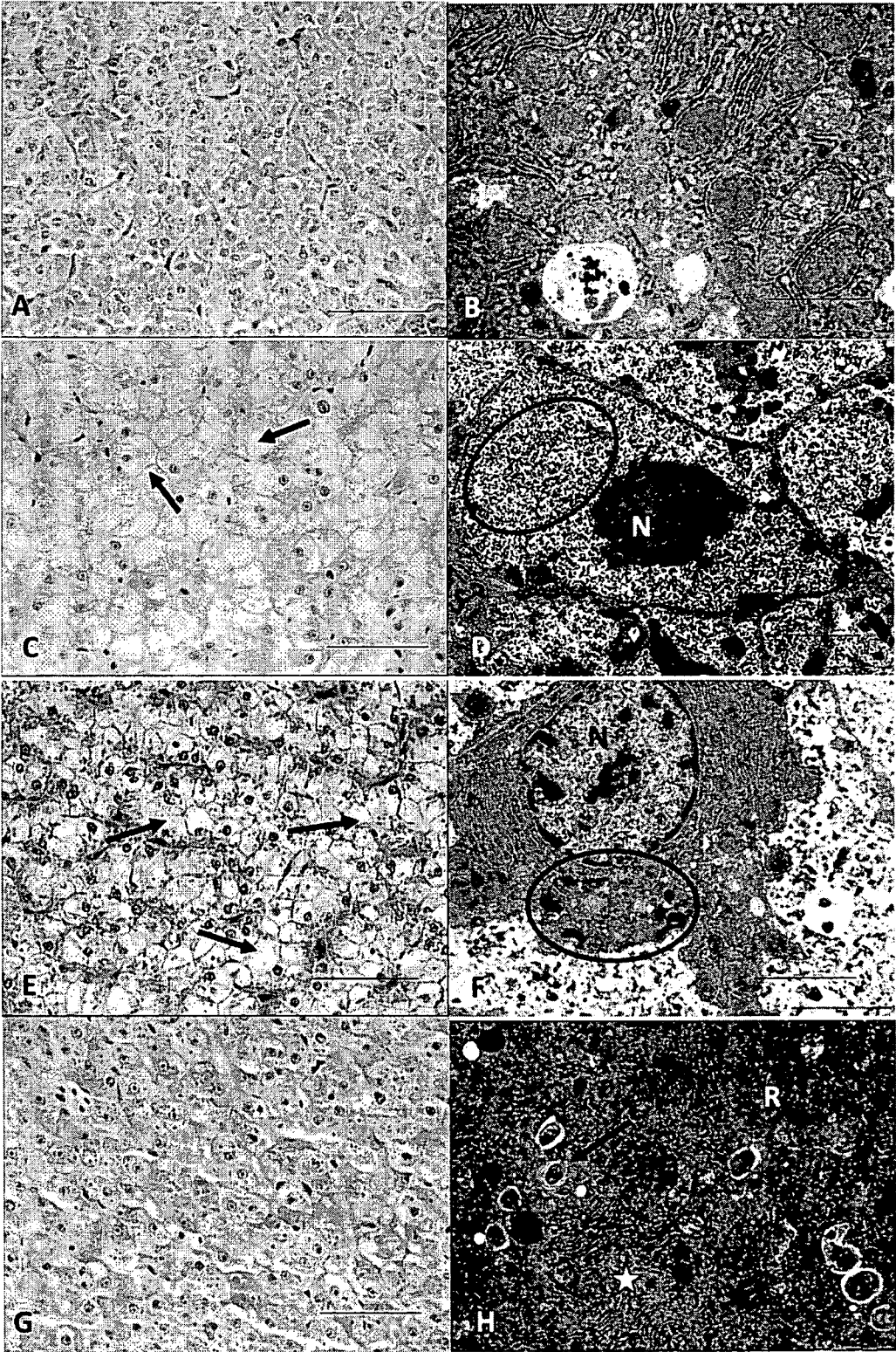
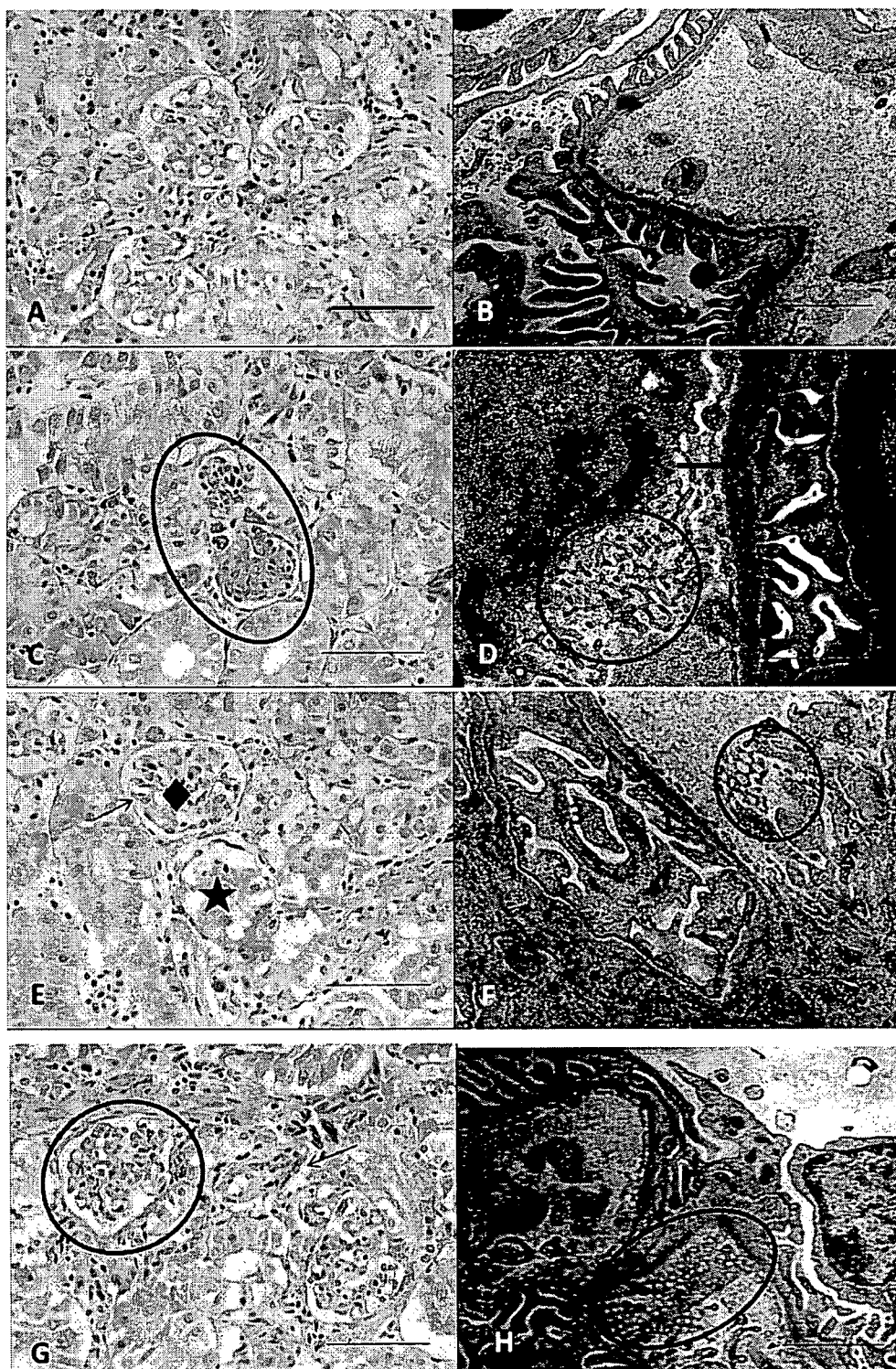
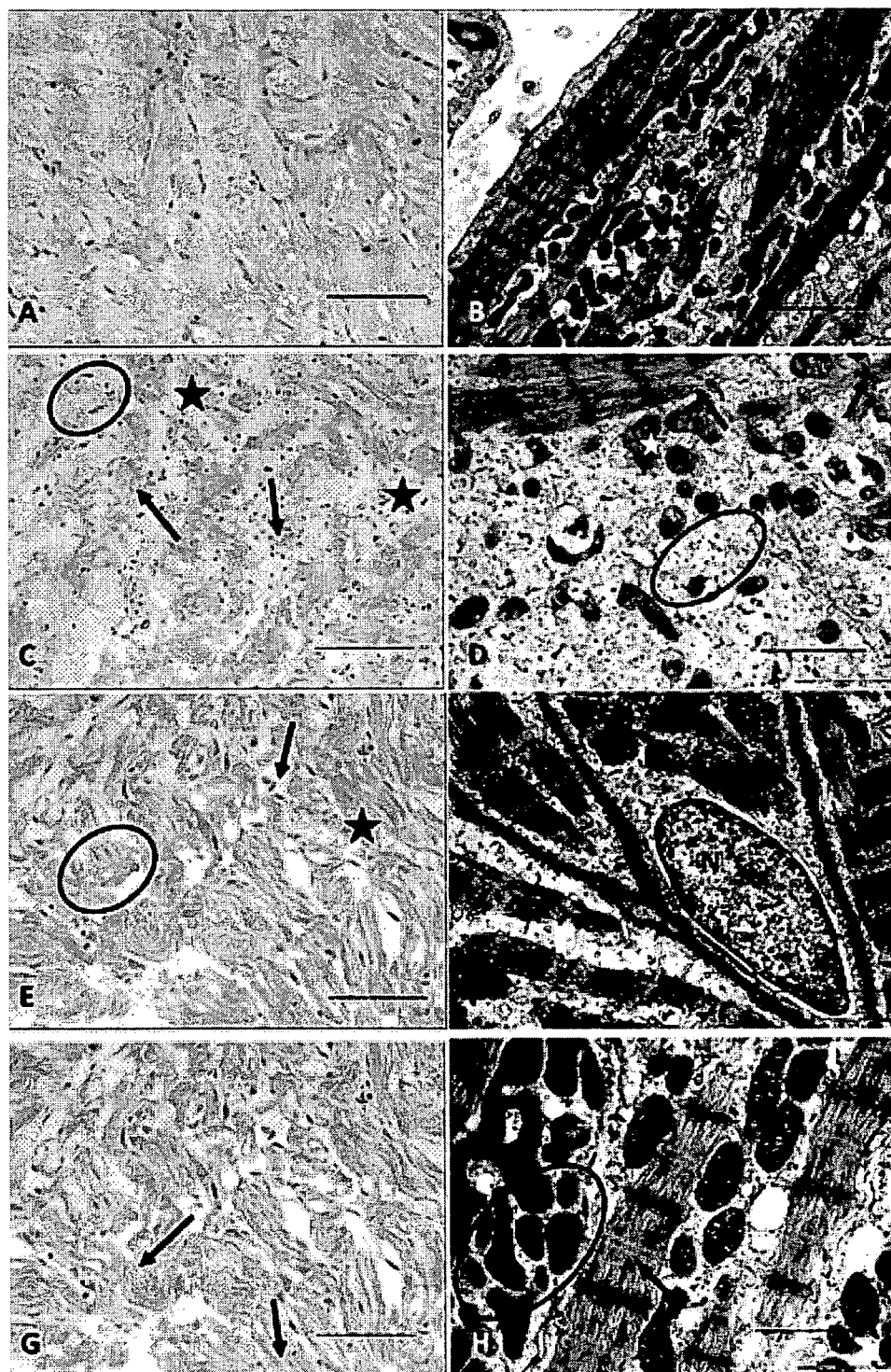


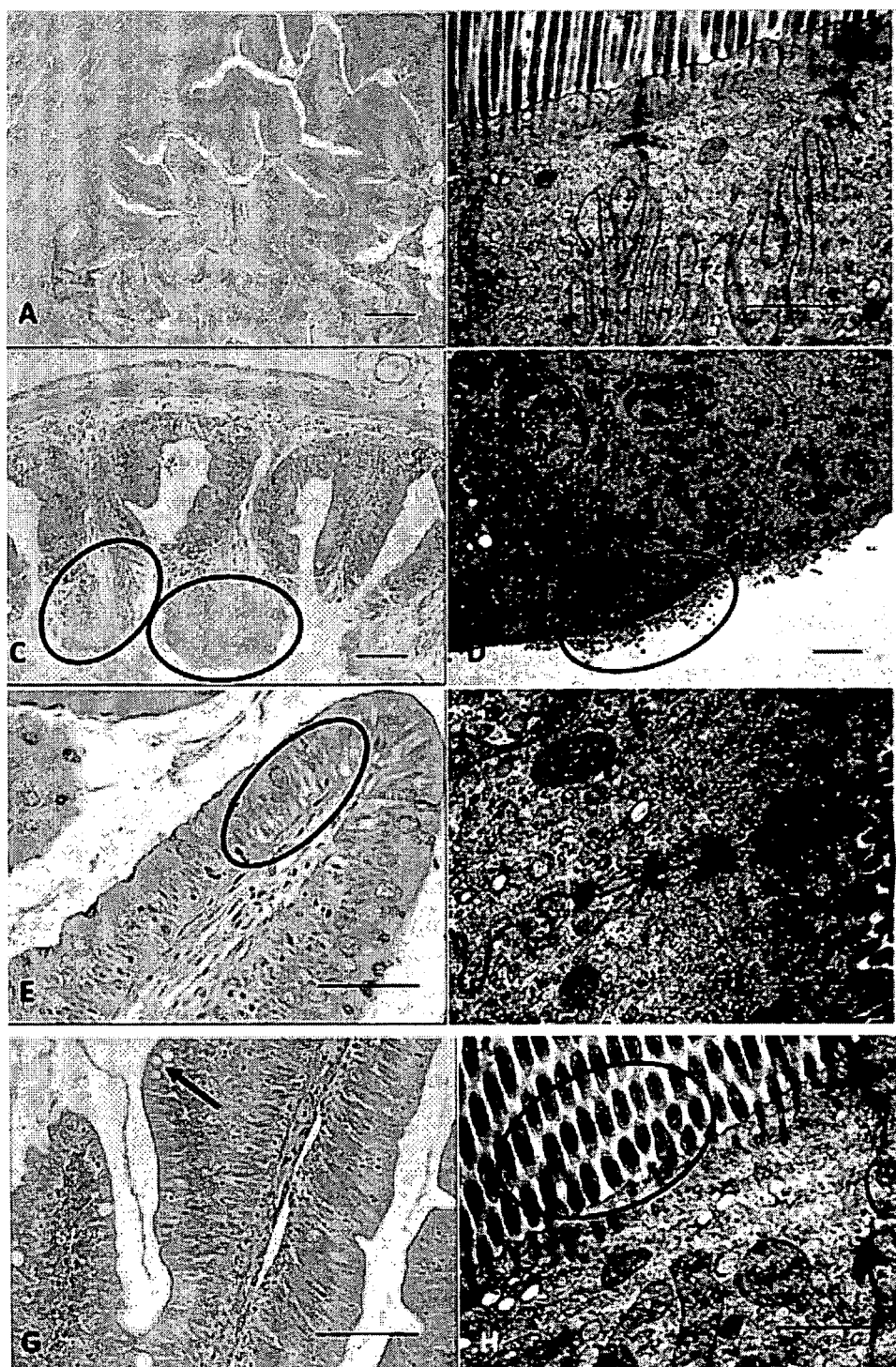
FIG. 1

2/4

**FIG. 2**

**FIG. 3**

4/4

**FIG. 4**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23K, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, INTERNET

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ATENCIO, L. et al. Protective effect of selenium from oxidative stress in different fish species (Tench and Tilapias) under laboratory conditions. Toxicology letters, October 2008 (on-line), vol, 180 (1), page S193.	1-13
X	GEHRINGER, M. et al. An investigation into the effect of selenium supplementation on microcystis hepatotoxicity. Toxicon, 2003, vol. 41, pages 1-8.	1-13
X	AMARAL MONTEIRO, D et al. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxá, Brycon cephalus (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology, part c, July 2008 (on-line) vol. 149, pages 40-49.	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31.March.2010 (31.03.2010)

Date of mailing of the international search report

(05/04/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

A. Polo Díez

Telephone No. +34 91 349 55 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/000545

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ORUN, I. et al. Antioxidative role of selenium on some tissues of (Cd 2+, Cr 3+) induced rainbow trout. Ecotoxicology and Environmental Safety, October 2007 (on-line), vol. 71, pages 71-75.	1-13
X	LIN Y. et al The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, Epinephelus malabaricus, fed high copper. Aquaculture, 2007, vol. 267, pages 38-43.	1-13
A	JP 7099858 A (NIPPON SUISA KAISHA) 18.04.1995, abstract. [online] Retrieved from : EPO PAJ. [retrieved on 22.03.2010]	
A	JP 6113753 A (ASAHI CHEMICAL IND.) 26.04.1994, abstract. [online] Retrieved from : EPO PAJ. [retrieved on 22.03.2010]	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/000545

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 7099858 A	18.04.1995	JP 3013871 B	28.02.2000 28.02.2000 28.02.2000
JP 6113753 A	26.04.1994	JP 2973053 B	08.11.1999 08.11.1999 08.11.1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/000545

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 33/04 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2009/000545

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A23K, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, INTERNET

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	ATENCIO, L. et al. Protective effect of selenium from oxidative stress in different fish species (Tench and Tilapias) under laboratory conditions. Toxicology letters, octubre 2008 (en-línea), vol, 180 (1), página S193.	1-13
X	GEHRINGER, M. et al. An investigation into the effect of selenium supplementation on microcystis hepatotoxicity. Toxicon, 2003, vol. 41, páginas 1-8.	1-13
X	AMARAL MONTEIRO, D et al. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxá, Brycon cephalus (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology, part c, julio 2008 (en-línea) vol. 149, páginas 40-49.	1-13

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

31.Marzo.2010 (31.03.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

05- ABRIL- 2010 (05/04/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

A. Polo Díez

N° de teléfono +34 91 349 55 24

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000545

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	ORUN, I. et al. Antioxidative role of selenium on some tissues of (Cd 2+, Cr 3+) induced rainbow trout. <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i> , octubre 2007 (en-línea), vol. 71, páginas 71-75.	1-13
X	LIN Y. et al The effects of dietary selenium on the oxidative stress of grouper, <i>Epinephelus malabaricus</i> , fed high copper. <i>Aquaculture</i> , 2007, vol. 267, páginas 38-43.	1-13
A	JP 7099858 A (NIPPON SUISA KAISHA) 18.04.1995, resumen. [en línea] Recuperado de: EPO PAJ. [recuperado el 22.03.2010]	
A	JP 6113753 A (ASAHI CHEMICAL IND.) 26.04.1994, resumen. [en línea] Recuperado de: EPO PAJ. [recuperado el 22.03.2010]	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000545

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
JP 7099858 A	18.04.1995	JP 3013871 B	28.02.2000 28.02.2000 28.02.2000
-----	-----	-----	-----
JP 6113753 A	26.04.1994	JP 2973053 B	08.11.1999 08.11.1999 08.11.1999
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 33/04 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)