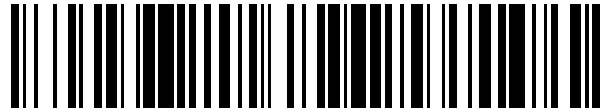


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 444**

21 Número de solicitud: 201600901

51 Int. Cl.:

<b>A61K 33/04</b>	(2006.01)
<b>A23L 2/52</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/16</b>	(2006.01)
<b>A61P 39/06</b>	(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**19.10.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.04.2018**

Fecha de concesión:

**18.01.2019**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**25.01.2019**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)  
Dirección General de Transferencia del  
Conocimiento Paseo de las Delicias s/n Pabellón  
de Brasil  
41013 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

**OJEDA MURILLO, Maria Luisa ;  
NOGALES BUENO, Fátima;  
DIAZ CASTRO , Javier;  
MURILLO TARAVILLO , Maria Luisa y  
CARRERAS SÁNCHEZ , Olimpia**

54 Título: **Uso del selenito sódico para elaborar un suplemento nutricional, una bebida o un medicamento para reparar el daño en el DNA provocado por el exceso de consumo de alcohol agudo**

57 Resumen:

La invención se refiere al uso de Selenio como selenito sódico, de fórmula (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) que es la forma inorgánica más común de suplemento nutricional, derivados o cualquiera de sus combinaciones en la elaboración de un suplemento nutricional, bebida y/o medicamento para la prevención o la reparación del daño celular, en concreto de la prevención del daño de DNA provocado por alcohol. Tiene su aplicación en el sector farmacéutico, concretamente en el de los alimentos funcionales.

ES 2 664 444 B1

## DESCRIPCIÓN

Uso del selenito sódico para elaborar un suplemento nutricional, una bebida o un medicamento para reparar el daño en el DNA provocado por el exceso de consumo de alcohol agudo.

### 5 Objeto de la invención

La invención se refiere al uso de Selenio como selenito sódico, de fórmula ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) que es la forma inorgánica más común de suplemento nutricional, derivados o cualquiera de sus combinaciones en la elaboración de un suplemento nutricional, bebida y/o medicamento para la prevención o reparación del daño celular, en concreto  
10 de la prevención del daño de DNA provocado por alcohol. Tiene su aplicación en el sector farmacéutico, concretamente en el de los alimentos funcionales.

### Estado de la técnica

El término *binge drinking* (BD) o botellón, en España, se asocia a una ingesta de alcohol aguda de 4 (mujer) o 6 (hombres) bebidas, en un tiempo de 4-6 horas,  
15 alcanzando unos niveles de alcohol en sangre de 0.08 g/L, estando este patrón intercalado por algunos días de abstinencia. Este patrón de consumo produce numerosas consecuencias sociales y está relacionado con diversas patologías, entre ellas, alteraciones en el sistema nervioso central y diversas enfermedades cardiovasculares, algunas de ellas relacionadas con el estrés oxidativo.

20 El organismo presenta tres vías mediante las cuales se produce el metabolismo del alcohol: la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE) y la catalasa (CAT) (1), cada una de estas vías lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) y, por lo tanto, al desbalance del estado oxidativo (2). En el consumo agudo tipo BD se produce una mayor activación del  
25 citocromo P450 2E1 (CYP2E1), isoforma del SMOE, lo que induce a una mayor producción de radicales libres que satura los sistemas antioxidantes del organismo, favoreciendo la oxidación de las biomoléculas y desembocando finalmente en daño celular (3), alterando la síntesis y metilación del DNA (4). En concreto, nuestro grupo de investigación (CTS-193) ha encontrado un desequilibrio del glutatión (GSH)  
30 hepático y una disminución de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), aumentos de la CAT y superóxido dismutasa (SOD) y un aumento de la NAPH oxidasa en un nuevo modelo de ratas adolescentes expuestas a BD (5). Además hemos comprobado que el alcohol crónico "per se", y no sólo la malnutrición, produce

deficiencia de Selenio (Se), pues al generar especies reactivas de oxígeno (ROS) el organismo consume Se para sintetizar la enzima antioxidante GPx (6).

El selenio (Se) es un micronutriente esencial, presente en numerosos alimentos al que se le ha conferido un importante papel como antioxidante ya que forma parte de más de 25 selenoproteínas, entre las que se encuentra la familia de las glutatión peroxidasa (GPx) (7). Se postula que el Se modula el estrés oxidativo, principalmente, a través de las diferentes GPxs, reduciendo los niveles de peróxido de hidrógeno, lípidos y fosfolípidos hidroperóxidos (8). Por esta razón, entre otras, la deficiencia de Se ha sido relacionada con diversas alteraciones, como el cáncer, el deterioro de las funciones inmunes, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la enfermedad alcohólica (9), entre otras. Algunas de ellas relacionadas con el estrés oxidativo y la estabilidad del DNA. De hecho, un aumento de la inestabilidad genómica, inherente o inducida por algún factor exógeno ha sido considerada como uno de los principales factores que conducen a una transformación neoplásica (10).

En este contexto, recientemente, este grupo de investigación ha demostrado que en ratas adolescentes que consumen alcohol en forma de BD, existe disminución de la estabilidad del DNA, además la homeostasis de Se también está alterada, sin que exista malnutrición en estas ratas. Así se observa una depleción de Se en suero e hígado proporcional a una menor actividad de la GPx3 en suero y GPx1 en hígado. Todo esto podría estar relacionado con la baja expresión de NFkB en el hígado, factor transcripcional que juega un papel muy importante en los procesos inflamatorios y apoptóticos (11).

Pocos estudios se refieren a la problemática del fenómeno “botellón” de jóvenes adolescentes sobre el estado del Se y de las selenoproteínas, y su acción antioxidante frente al alcohol. Tras revisar la literatura no hemos encontrado estudios que indiquen que un suplemento de Se a los jóvenes con consumo de alcohol tipo botellón, y menos aún no hay indicios que el Se actúe previniendo el daño celular, en concreto el daño en el DNA, evitando la rotura de la doble hélice del DNA provocada por un consumo agudo tipo BD, con el consiguiente beneficio que supondría a la sociedad esta suplementación económica y eficaz a los jóvenes que hacen el botellón, que podrían, finalmente, evitar un daño orgánico en la adolescencia sometida al botellón, pudiendo ser beneficioso para el resto de su vida. En la bibliografía consultada, hemos encontrado solo 4 patentes relativas a los métodos de administración de Se. Sin embargo, no hemos encontrado ninguna patente dedicada al suplemento de selenio y

la ingesta de alcohol aguda *tipo botellón*. En cuanto a los trabajos publicados hay algunos que reportan que el Se tiene efecto neuroprotector y otros que concluyen que el Se previene el estrés oxidativo provocado por el alcohol, aumentando las enzimas antioxidantes. La diferencia de estos trabajos con el que se presenta en la Memoria, es que la forma y ruta de administración del alcohol así como la dosis empleada es muy diferente a la empleada por nuestro grupo en este consumo agudo “tipo botellón”, y que ninguno de estos trabajos mide el daño del DNA y menos aún cómo un suplemento de Se a los jóvenes puede revertir este daño en el DNA, provocado por el botellón, a través de un aumento de la enzima antioxidante GPx, que disminuye las EROs, y/o a través del glutati6n (GSH), del ciclo de la metionina. Todos los dem6s trabajos encontrados, que trabajen con este suplemento y el estado de alcohol agudo, han sido los publicados y firmados por nuestro grupo (5,6,11,12-18)

Por todo esto en esta Invenci6n presentamos al suplemento de Se, en forma de selenito s6dico, como una alternativa terap6utica frente al da6o oxidativo en biomol6culas y, principalmente, en la prevenci6n o reparaci6n del da6o celular, manifestado por la inestabilidad del DNA causada por el exceso de consumo de alcohol agudo, que pudiera repercutir en un da6o org6nico.

#### Referencias

1. Lieber CS. Alcohol and hepatitis C. *Alcohol Res Health*. 2001;25(4):245-54.
2. Zima T, Fialov6 L, Mestek O, Janebov6 M, Crkovsk6 J, Malbohan I, St6pek S, Mikul6kov6 L, Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci*. 2001 Jan-Feb;8(1):59-70
3. Artun BC, K6sk6-Kiraz Z, G6ll6ođlu M, Cevikbař U, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol* 2010; 29:659–665.
4. Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM. Folate deficiency, methionine meta bolism, and alcoholic liver disease. *Alcohol*. 2002 Jul;27(3):169-72.
5. Nogales F, Rua RM, Ojeda ML, Murillo ML, Carreras O. Oral or intraperitoneal binge drinking and oxidative balance in adolescent rats. *Chem Res Toxicol* 2014; 27:1926–1933.

6. Ojeda ML, Nogales F, Vázquez B, Delgado MJ, Murillo ML, Carreras O (2009) Alcohol, gestation and breastfeeding: selenium as an antioxidant therapy. *Alcohol Alcohol* 2009; **44**:272–277.
7. Carreras O, Ojeda ML, Nogales F. *Selenium Dietary Supplementation and Oxidative Balance in Alcoholism*. In. *Molecular aspect of Alcohol and Nutrition.*, Edited by Vinood B. Patel, PhD Department of Biomedical Sciences, Faculty of Science and Technology, University of Westminster, London, UK Academic Press, 2016.
8. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000 Jul 15;356(9225):233-41.
- 9 Tinggi U. Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environ Health Prev Med*. 2008 Mar;13(2):102-8.
10. El-Bayoumy K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res*. 2001 Apr 18;475(1-2):123-39.
11. Ojeda ML, Rúa RM, Murillo ML, Carreras O, Nogales F. Binge drinking during adolescence disrupts Se homeostasis and its main hepatic selenoprotein expression. *Alcohol Clin Exp Res*. 2015 May;39(5):818-26.
12. Jotty K, Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium dietary supplementation as a mechanism to restore hepatic selenoprotein regulation in rat pups exposed to alcohol. *Alcohol* 2013; **47**:545–552.
13. Nogales F, Ojeda ML, Fenutría M, Murillo ML, Carreras O. Role of selenium and glutathione peroxidase on development, growth, and oxidative balance in rat offspring. *Reproduction*. 2013 Oct 29;146(6):659-67.
14. Ojeda ML, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium or selenium plus folic acid-supplemented diets ameliorate renal oxidation in ethanol-exposed pups. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012 Nov;36(11):1863-72.
15. Nogales F, Ojeda ML, Delgado MJ, Jotty K, Diaz Castro J, Murillo ML, Carreras O. Effects of antioxidant supplementation on duodenal Se-Met absorption in ethanol-exposed rat offspring in vivo. *J Reprod Dev*. 2011 Dec;57(6):708-14.
16. Delgado MJ, Nogales F, Ojeda ML, Murillo ML, Carreras O. Effect of dietary selenite on development and intestinal absorption in offspring rats. *Life Sci*. 2011 Jan 17;88(3-4):150-5.
17. Ojeda ML, Jotty K, Nogales F, Murillo ML, Carreras O. Selenium or selenium plus folic acid intake improves the detrimental effects of ethanol on pups' selenium balance. *Food Chem Toxicol*. 2010 Dec;48(12):3486-91.

18. Jotty K, Ojeda ML, Nogales F, Rubio JM, Murillo ML, Carreras O. Selenium tissue distribution changes after ethanol exposure during gestation and lactation: selenite as a therapy. *Food Chem Toxicol.* 2009 Oct;47(10):2484-9.

5 **Descripción de las figuras**

**Figura 1.** Clases de *Comets* posibles (0 para ausencia de daño y 4 para máximo daño).

10 **Figura 2.** Efectos del Suplemento de Selenio sobre el Porcentaje de Fluorescencia en la Cabeza del COMET (representando el porcentaje de DNA en la cabeza) en linfocitos de sangre periférica tras el *Binge drinking*. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Significación estadística: A vs C: \*\*\* P<0.001; ASE vs A: \*\*\*P<0.001

15 **Figura 3.** Efectos del Suplemento de Selenio sobre el Porcentaje de Fluorescencia en Cola (representando el porcentaje de DNA en la cola) en los linfocitos de sangre periférica tras el *Binge drinking*. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Significación estadística: A vs C: \*\*\* P<0.001; ASE vs A: \*\*\*P<0.001

**Figura 4.** Efectos del Suplemento de Selenio sobre el OTM en los linfocitos de sangre periférica tras el *Binge drinking*. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Significación estadística: A vs C: \*\*\* P<0.001; ASE vs A: \*\*\*P<0.001

20 **Figura 5.** Efectos del Suplemento de Selenio sobre los niveles de Glutati6n hepático (GSH) (µmol/g tejido) tras el *Binge drinking*. Los resultados se expresan como la media ± SEM. Significación estadística: A vs C: \*\*\* P<0.001; ASE vs A: \*\*\*P<0.001

25 **Figura 6.** Versi6n simplificada de los efectos producidos por el *Binge drinking* y el Selenio sobre el metabolismo de la metionina. *Binge drinking* inhibe 5-metiltetrahidrofolato, Homocisteina, Cistationenina y GSH e inhibe el paso de metionina a S-adenosilmetionina. Selenio (Se) favorece la producci6n de GSH.

**Descripci6n de la invenci6n**

30

La invenci6n se refiere al uso del Selenito s6dico, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, para la elaboraci6n de un suplemento nutricional, una bebida y/o un medicamento para combatir el daño en el

DNA somático que acompaña al exceso de consumo de alcohol agudo, sobre todo en los adolescentes. El Selenio, en forma de Selenito sódico, es considerado como un micronutriente o elemento traza esencial, debido a que no puede ser sintetizado por el organismo pero es indispensable para su normal funcionamiento. El Selenio se encuentran en una amplia gama de fuentes dietéticas y su función principal es proteger al organismo frente al daño oxidativo, ya que forma parte de la Glutatión peroxidasa (GPx). Sin embargo, en determinadas patologías en las que exista deficiencia de selenio, entre otras el consumo de alcohol crónico o agudo, está justificada la suplementación con este micronutriente ya que estas deficiencias afectan a las enzimas antioxidantes pudiendo provocar daño a nivel de la peroxidación lipídica, proteica e incluso en la estabilidad del DNA, con rotura de la doble hélice, que es uno de los tipos más severos de daño del DNA. En la invención que se presenta se ha suplementado con selenito sódico ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) concomitantemente a un consumo agudo de alcohol, *el botellón*, revirtiendo el daño oxidativo provocado por el botellón, en el DNA. En concreto retorna la rotura del DNA a valores controles a nivel de la cabeza del DNA (Head % DNA), de la cola (Tail % DNA) y del Momento Olive de la cola OTM (Olive Tail Moment), evitando el daño celular y futuro daño orgánico. El mecanismo de acción podría estar relacionado con el aumento de la enzima antioxidante GPx, que disminuye las EROs, y/o con el ciclo de la metionina a través del glutatión (GSH).

La suplementación con Se, en forma de selenito sódico, simultáneo a un consumo agudo tipo *binge drinking* o *botellón*, disminuye el porcentaje de fluorescencia medida en la cola (Tail) y en el OTM de linfocitos de sangre a niveles controles y aumenta el porcentaje de la cabeza (Head) demostrando que el Selenio tiene un gran poder preventivo en el efecto deletéreo del alcohol sobre la estabilidad del DNA pudiendo revertir la rotura de la doble hélice del DNA y con ello el daño celular pudiendo finalmente evitar un daño orgánico, de peores consecuencias. En concreto, este efecto podría estar relacionado con el aumento de la GPx o con el papel que el Se juega en el ciclo de la metionina y la metilación del DNA, ya que afecta a los niveles de GSH hepáticos, un intermediario de este ciclo. El suplemento de Se aumenta los niveles de GSH hepático favoreciendo la metilación del DNA.

Así pues, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de Selenio como selenito sódico de fórmula ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) que es la forma inorgánica más común de suplemento nutricional, derivados o cualquiera de sus combinaciones en la elaboración de un

suplemento nutricional, bebida o medicamento para la prevención o reparación del daño celular, en concreto de la prevención del daño de DNA provocado por alcohol.

El término “derivado” incluye tanto los compuestos farmacéuticamente aceptables, es decir derivados de la fórmula ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), que pueden ser utilizados para la elaboración de un medicamento, como los derivados farmacéuticamente no aceptables que pueden ser utilizados en la preparación de derivados farmacéuticamente aceptables. En la presente invención el término “suplemento nutricional” correspondería a aquella sustancia ingerida que necesitaría el organismo para complementar la dieta. El término “medicamento” hace referencia a toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades o que pueda usarse o administrarse a seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas (*LEY 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE 178, 2006*)

Por “daño celular” en la invención se refiere a cualquier anomalía funcional o estructural de etiología diversa que afecte a la estabilidad de biomoléculas entre ellas, el DNA y que finalmente pudiera desembocar en un daño orgánico hasta ahora no estudiado.

El Selenito sódico, suplemento nutricional, derivados o análogos, puede administrarse de una forma pura a un mamífero y preferiblemente a un humano, o puede administrarse como parte de una composición más compleja, donde la cantidad sería aquella que mostrara el efecto deseado, siendo en éste caso una cantidad efectiva, desde 0.25 hasta 0.4 ppm de Selenio, aunque preferentemente 0.4 ppm. Por todo esto, una persona que necesite el Selenito sódico lo puede ingerir en forma de composición farmacéutica o como parte de un suplemento dietético o como una matriz alimentaria en la que este compuesto o sus derivados se añaden en una cantidad efectiva. Este es el caso de: las nueces de Brasil, semillas girasol, pescados (atún, sardinas, lenguados, salmón), los mariscos, la carnes o vísceras, huevos, setas, granos, cebollas, etc.

Los requerimientos nutricionales de Selenio se relacionan directamente con las consecuencias adversas que presentan la sobreexposición y la deficiencia de selenio en el metabolismo corporal, siendo de gran relevancia para la necesidad de saturar su capacidad antioxidante, así como otros desórdenes metabólicos tipo desequilibrios de



hormonas tiroideas, enfermedades cardiovasculares, cáncer o VIH o enfermedad alcohólica.

El requerimiento nutricional de Selenio está en base a las recomendaciones de ingesta diaria de Selenio, que en modelos animales, el Consejo de Investigaciones Norteamericano (NRC) 2007, ha establecido una ingesta entre 0.1 ppm a 0.15 ppm de selenio como necesaria para mantener el máximo rendimiento de la actividad de Glutathion peroxidasa hepática y soportar el óptimo crecimiento de las ratas de laboratorio.

#### 10 **Modo de realización de la invención**

A continuación se detalla un ejemplo mediante ensayos realizados de cómo el consumo de selenio en forma de selenito es capaz de prevenir el daño o la rotura del DNA asociada al botellón. Para ello se ha estudiado la integridad en la expresión génica de células eucariotas con propiedades idénticas a otras células somáticas a partir de la evaluación de la integridad en el DNA. Así los efectos que el alcohol y los suplementos de selenio provocan en el DNA de los linfocitos podrán reflejar y representar, en cierta medida, los efectos del etanol y del Se sobre el organismo. Es una técnica muy utilizada en la comunidad científica para evaluar la genotoxicidad del alcohol y también se utiliza para monitorizar posibles daños en el DNA en estudios epidemiológicos.

La invención se llevó a cabo diseñando un estudio tipo experimental prospectivo, en el que para la realización del trabajo los animales (ratas) se distribuyeron, de manera aleatoria, en cuatro grupos experimentales:

- **C:** rata adolescente alimentada *ad libitum* con comida y agua y administración intraperitoneal (IP) de solución salina isotónica (SSI);
- **A:** rata adolescente alimentada *ad libitum* con comida y agua y en sus días correspondientes se le administra una solución de etanol IP al 20% (v/v) en solución salina isotónica (3g/Kg/día);
- **CSE:** rata adolescente alimentada *ad libitum* con dieta suplementada con Se y agua y en los días correspondientes se les administra IP una SSI;
- **ASE:** rata adolescente alimentada *ad libitum* con dieta suplementada con Se y agua y en sus días correspondientes se le administra una solución de etanol IP al 20% (v/v) en solución salina isotónica (3g/Kg/día).

La alimentación suministrada a los animales consistió en una dieta básica semisintética (2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Laboratories, Barcelona, Spain) que cubría todas las necesidades nutricionales y energéticas, que contiene 0.23 ppm de Se y que fue suministrada *ad libitum*. Los grupos suplementados con Se (CSe y ASe) recibieron selenio, en el agua de bebida, en forma de selenito sódico pentahidratado hasta llegar a 0.4 ppm de Se durante todo el periodo experimental. El método de alcoholización empleado ha sido la administración por vía intraperitoneal, tres días por semana y durante tres semanas, de etanol (3 g/Kg) en solución salina al 20% (v/v). Al final del procedimiento se anestesia con uretano al 28% p/v (0.5 ml/100 g peso) y se extrae la sangre periférica mediante punción de la vena caudal.

Para la determinación del daño en el DNA se utilizó la variante de *Comet alcalino*. El procedimiento consiste en preparar portas de cristal con agarosa (HMP al 1% con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destilada). Posteriormente se procedió al aislamiento de linfocitos mediante tratamiento de la muestra de sangre periférica de la vena caudal con tampón fosfato salino (PBS). En el fondo del eppendorf se depositó Histopaque y se centrifugó obteniéndose una fase rosa que se trató resuspendiéndola en una segunda tanda de eppendorffs para eliminar el Histopaque que resultó ser tóxico para la célula. Finalmente se centrifugan las muestras hasta la obtención de los linfocitos aislados. Estos se resuspenden en agarosa LMP al 1% en PBS por lo que se embeben las células en agarosa y se procede a la lisis de las membranas plásmáticas, con solución de lisis y Triton X, para que quedase al descubierto el nucleoide con el material genético, donde se evaluó el posible daño. Y se procedió a una electroforesis (solución alcalina), neutralización, para frenar el ataque básico y tinción fluorescente con un marcador fluorescente ó 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y observación al microscopio de fluorescencia Leika DMLS. Para finalmente proceder a su cuantificación, donde se contabilizaron 100 *comets* por cada gel, encuadrándoles dentro de cada una de las 5 clases de *Comets* posibles (0 para ausencia de daño y 4 para daño máximo (Figura 1). Una mayor cantidad de fragmentos de DNA en la cola indicaba un mayor daño en ésta biomolécula. Todavía, para un análisis más fiables se utilizó la cámara Hitachi empleando el software de imágenes Kinetic Imaging Komet 5.5, que nos permitió usar los siguientes parámetros para la cuantificación del daño en el DNA: el porcentaje de fluorescencia en la cola del comet (representando la fracción de DNA en la misma), porcentaje de DNA en la cabeza (representando la fracción de material genético en la

misma) y el Olive Tail Moment (que se define como el producto de la longitud de la cola del *comet* y la fracción de DNA en la misma).

$$\text{OTM} = [\text{Media de la cola} - \text{media de la cabeza}] \times \% \text{ de DNA en cola} / 100$$

Los resultados fueron analizados por un programa estadístico (GraphPad InStat 3, CA, USA) mediante el análisis de la varianza. Una vez realizado el ANOVA one-way se obtuvo una  $p < 0.001$  para los tres parámetros estudiados. Posteriormente para las múltiples comparaciones entre las medias se realiza el test de Tukey-Kramer.

En la Figura 2 se aprecia una disminución del porcentaje de DNA en la cabeza (% Head DNA) en los animales sometidos a exceso de consumo de alcohol agudo con respecto a sus controles. Sin embargo un suplemento de Se concomitante al botellón restablece estos valores % Head DNA.

Como se puede observar en las Figuras 3 y 4 el porcentaje de DNA en la cola (% Tail DNA) aumenta tras la exposición de alcohol, con respecto a sus controles. El Olive Tail Moment (OTM) también estuvo extremadamente aumentado en el grupo alcohol, en relación con los controles. Además hemos comprobado como un suplemento de Selenio en forma de selenito, al *binge drinking o botellón*, puede revertir los % de DNA en la cola y los OTM hasta valores controles. Este índice resulta particularmente útil, ya que proporciona la medida más estable para determinar el daño en el DNA en términos relativos, porque presenta un mayor grado de uniformidad en dispersiones cuartiles.

Además se determinó el glutatión (GSH), como antioxidante endógeno y producto de la metilación, mostrando que el suplemento de Se concomitantemente a una ingesta de alcohol tipo botellón aumenta los niveles de glutatión (Figura 5).

En conclusión, se ponen de manifiesto que el exceso de consumo de alcohol agudo, altera la estabilidad del material genético, a diferentes niveles relacionados con el ciclo de la metionina (Figura 6), provocando daño en el DNA y por tanto aumenta la frecuencia de rotura en la doble hélice, lo que hace que incremente el porcentaje de DNA en la cola. La ingesta de alcohol, tipo *binge drinking o botellón*, y un suplemento simultáneo de selenio podría revertir la inestabilidad del material genético, con la correspondiente rotura del DNA, disminuyendo así la rotura en la doble hélice lo que hace que disminuye el porcentaje de DNA en la cola. Por lo que el Se, en forma de selenito sódico, tiene un efecto beneficioso en la estabilidad del DNA en los animales

con ingesta de alcohol tipo *binge drinking* o *botellón* probablemente debido a su acción antioxidante directa o por favorecer la metilación del DNA a través de la síntesis de GSH (Figura 6).

5

10

15

20

25

**Reivindicaciones**

1. Uso del Selenito sódico conteniendo desde 0.25 hasta 0.4 ppm de Selenio, para elaborar una composición para tratar el daño en el DNA provocado por el exceso del consumo de alcohol agudo.
- 5 2. Uso del Selenito sódico conteniendo desde 0.25 hasta 0.4 ppm de Selenio, para elaborar una composición según la reivindicación 1, donde la composición 1 es un suplemento nutricional.
3. Uso del Selenito sódico conteniendo desde 0.25 hasta 0.4 ppm de Selenio, para elaborar una composición según la reivindicación 1, donde la  
10 composición 1 es una bebida.
4. Uso del Selenito sódico conteniendo desde 0.25 hasta 0.4 ppm de Selenio, para elaborar una composición según la reivindicación 1, donde la  
composición 1 es una medicamento.

15

20

25

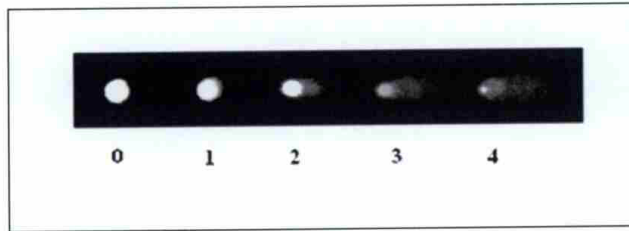


Figura 1

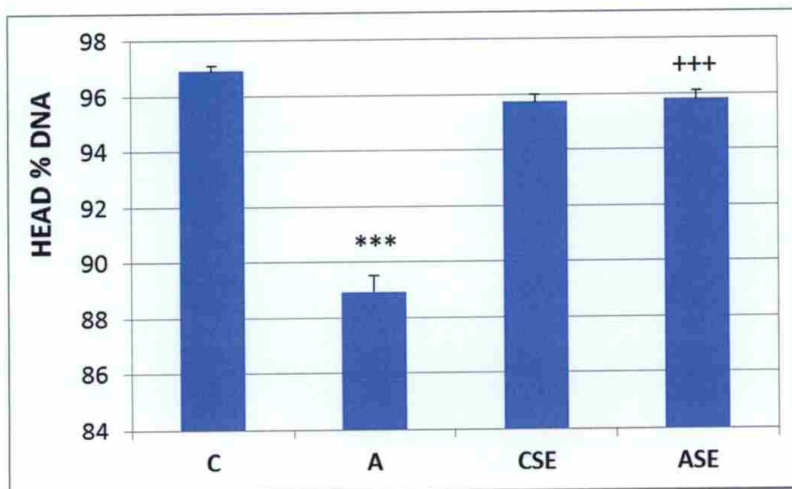


Figura 2

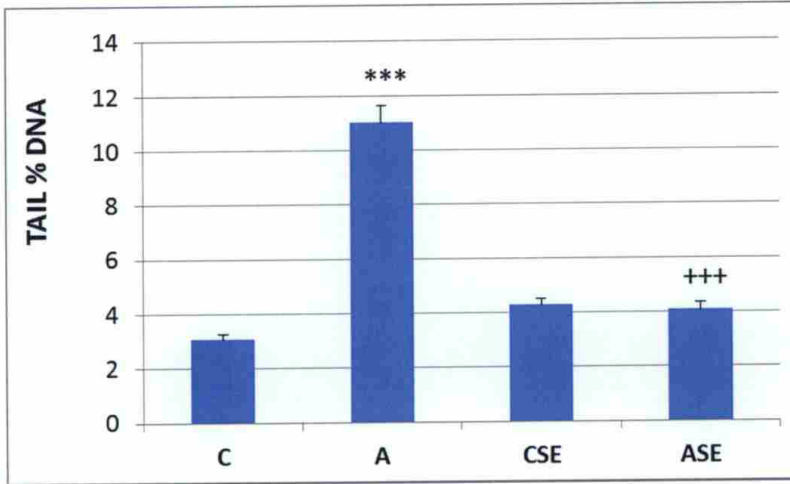


Figura 3

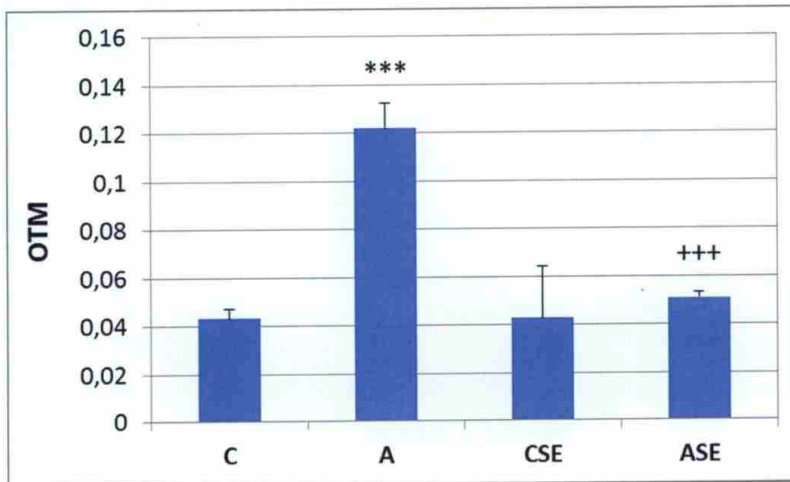


Figura 4

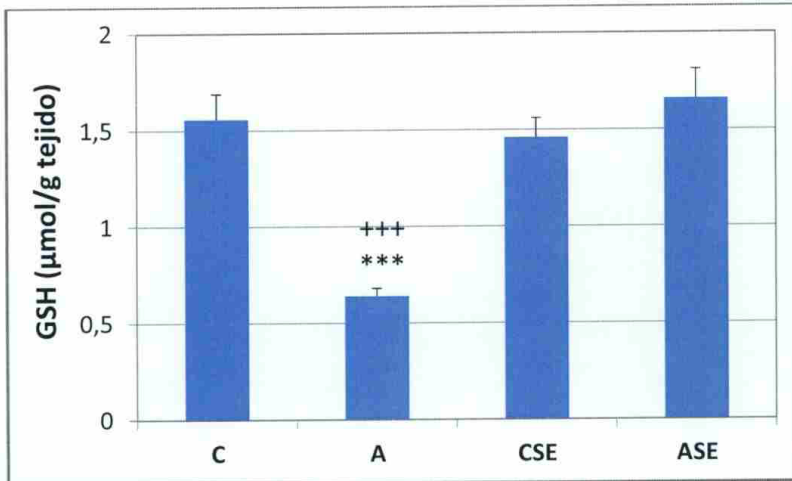


Figura 5

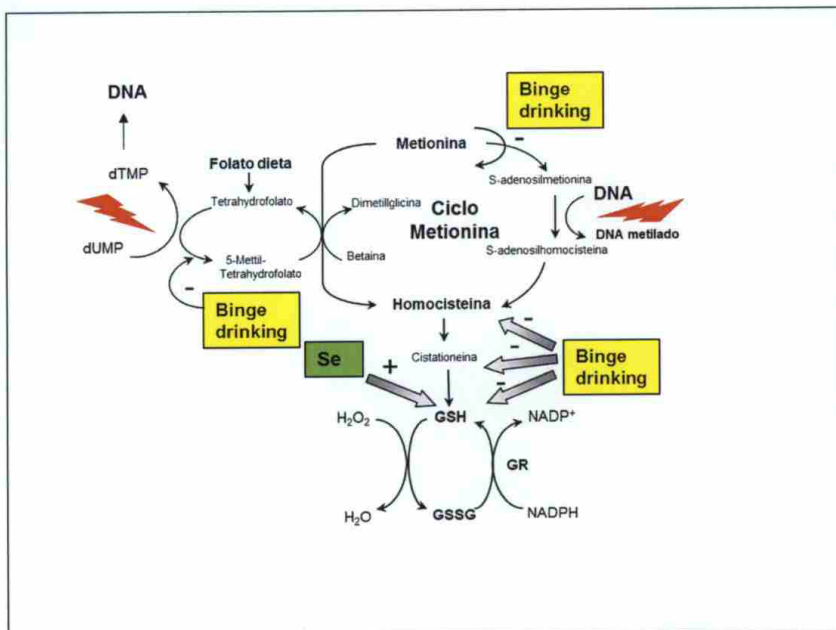


Figura 6





- ②① N.º solicitud: 201600901  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.10.2016  
 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
X	GUILLÉN POZA, P. A. et al. Binge drinking and adolescence, selenium as a preventive antioxidant: (XXXVII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences). Acta Physiologica. 01/09/2014, vol. 212, ISSN: 1748-1708. página 53, resumen P18.	1-4
X	JOTTY K.et al. Selenium dietary supplementation as a mechanism to restore hepatic selenoprotein regulation in rat pups exposed to alcohol. Alcohol, 2013, vol. 47, páginas 545-552, ISSN 0741-8329 (print) ISSN 1873-6823(electronic), DOI: doi:10.1016/j.alcohol.2013.07.004 materiales y métodos.	1-4
X	US 2003211172 A1 (JONES JEREMY PARK et al.) 13/11/2003, párrafos 1, 7, 9-12, 25, 31, 36.	1-4
X	US 2011250298 A1 (MULLER CHARLES and MULLER CHARLES THOMAS) 13/10/2011, párrafos 1, 8, 10, 12.	1-4
X	US 2008075710 A1 (CORNETT ERIK T et al.) 27/03/2008, párrafos 2, 9, 11, 22, 24-27.	1-4
X	US 5922346 A (HERSH THEODORE) 13/07/1999, Columna 3, líneas 41-50, página 7, línea 66-página 8, línea 26.	1-4
X	WO 0076492 A1 (NUTRI LOGICS INC et al.) 21/12/2000, Página 18, líneas 1-5, página 24, línea 25-página 26, línea 4.	1-4
A	US 2008057110 A1 (SKIRPA ALEXANDER) 06/03/2008, Párrafos 29-60.	1, 3

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:

<b>Fecha de realización del informe</b> 06.10.2017	<b>Examinador</b> A. I. Polo Díez	<b>Página</b> 1/4
---	--------------------------------------	----------------------

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K33/04** (2006.01)

**A23L2/52** (2006.01)

**A23L33/16** (2016.01)

**A61P39/06** (2006.01)

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

A61K, A23L, 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, INTERNET, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS, BD-TXTE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.10.2017

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-4	<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	Guillén Poza, P.A. et al. Acta Physiologica, Vol. 212, página 53	01.09.2014
D02	Jotty, K. Alcohol, 2013. Vol. 47, Nº 7, páginas 545-552,	31.10.2013
D03	US 2003211172 A1 (JONES JEREMY PARK et al.)	13.11.2003
D04	US 2011250298 A1 (MULLER CHARLES and MULLER CHARLES THOMAS)	13.10.2011
D05	US 2008075710 A1 (CORNETT ERIK T et al.)	27.03.2008
D06	US 5922346 A (HERSH THEODORE)	13.07.1999
D07	WO 0076492 A1 (NUTRI LOGICS INC et al.)	21.12.2000

**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****Novedad y actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 de L.P. 11/1986)**

En el documento D01 se describe el uso de selenito en agua de bebida (a una concentración de 0,3 ppm) como antioxidante preventivo para tratar a ratas que se han sometido a un consumo de alcohol agudo.

Aunque este documento no menciona explícitamente que la ingesta del selenito lleve aparejada la protección del DNA, el descubrimiento de que el selenito lleva a cabo esta actividad por parte de los solicitantes, no otorga novedad al uso del selenito para el tratamiento de la ingesta de alcohol, que ya era conocido en D01. Dicho de otra manera, utilizando el selenito en agua según el documento D01, es decir, para tratar el alcohol, uno de los efectos producidos en el individuo al que se le administra, es que protege el DNA de sus células aunque dicho efecto no se haya descrito en el documento.

Por tanto, el documento D01 afecta a la novedad de las reivindicaciones 1 a 4.

Los documentos D02 a D05 divulgan el uso de selenio para el tratamiento del alcoholismo, la ingesta de alcohol o los daños ocasionados por dicha ingesta.

La diferencia con la solicitud en estudio es que en estos documentos no se utiliza la misma concentración y, en algunos casos, el mismo compuesto de selenio.

Sin embargo, la solicitud no muestra claramente en su descripción (incluidos los ejemplos) un efecto técnico asociado al uso de un compuesto de selenio concreto y a la cantidad del mismo utilizada.

En la solicitud se utiliza únicamente el compuesto selenito sódico y se administra disuelto en el agua de beber en una concentración de 0,4 ppm. Este dato, por sí solo, no permite conocer la cantidad diaria de selenio que se ha ingerido, y por lo tanto, qué dosis sería adecuada para producir el mismo efecto si el selenio se administrara de otro modo como, por ejemplo, en un medicamento o en un suplemento nutricional. Por otra parte, la mera determinación de la concentración que resulta en un mejor efecto, no implica actividad inventiva si, como en este caso, tal efecto es conocido. Se considera que encontrar la concentración óptima es materia de experimentación rutinaria por parte del experto en materia que no requiere actividad inventiva.

Por lo tanto, cada uno de los documentos D02 a D05 afecta a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 4.

Por último, también es conocido en el estado de la técnica que la administración de selenio, en sus diversas formas, reduce el estrés oxidativo y por tanto, evita el daño producido en el DNA por los radicales óxidos de cualquier origen, como por ejemplo, el tabaco (ver documentos D06, columna 3, líneas 41-50, página 7, línea 66-página 8, línea 26 y D07, página 18, líneas 1-5, página 24, línea 25-página 26, línea 4).

Dado que ya se ha divulgado en el estado de la técnica, y por tanto es conocido, que la ingesta de alcohol produce estrés oxidativo, sería evidente para un experto en la materia, utilizar selenio, cuya eficacia en el tratamiento del estrés oxidativo de cualquier origen está probada, en el tratamiento de la ingesta de alcohol agudo.

En consecuencia, cualquiera de los documentos D06 o D07 afecta también a la actividad inventiva de las reivindicaciones 1-4.

En resumen, a la vista de cada uno de los documentos citados en el informe, ninguna de las reivindicaciones 1 a 4 cumple los requisitos de novedad ni de actividad inventiva, es decir, los requisitos de patentabilidad del art. 4.1 de la L.P de 11/1986.