

Estudio: Cambios en el Perfil de la Expresión Genética Resultantes del Consumo del Suplemento Dietético de ASEA Redox: Un Estudio Preliminar.  
 Revisión de Quórum #: 31790/1 y 32541/1 Investigador Principal: Dr. Kenneth Ward  
 Fecha de Aprobación del Sitio: 2 de Diciembre de 2016  
 Estatus: Reporte Final  
 Fecha del Reporte: 18 de Septiembre de 2017

### Revisión del Reporte

|   |                          |
|---|--------------------------|
| FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL:   | FECHA:                   |
|  | 18 de Septiembre de 2017 |
| 技術總監的簽名:  | 日期:                      |
|  | 18 de Septiembre de 2017 |

### Resumen del Estudio:

Este estudio observacional, aprobado por el IRB, fue armado como un estudio doble ciego, controlado con placebos, diseñado para determinar si los perfiles de la expresión genética cambian durante un período de 8 semanas como resultado del consumo de la bebida ASEA Redox. Se recolectaron muestras de sangre de 60 participantes en dos momentos determinados distintos: momento 0 y a las 8 semanas. Después de las 8 semanas posteriores al estudio, donde los participantes no consumieron ASEA Redox, se invitó a los participantes en el grupo de prueba a que se les extrajeran muestras de sangre. Los participantes fueron asignados al azar en el grupo de prueba (grupo A), placebos (grupo B) o grupo de control (grupo C). Los participantes realizaron un cuestionario de salud y un registro de "síntomas" a lo largo del curso del estudio. La demografía del estudio reflejó una relación en la que el 41% eran hombres, 59% eran mujeres y se tenía una edad promedio de 35. El grupo de participantes del estudio consistió en 92% de raza blanca. El ARN se extrajo de las muestras de sangre, se analizaron los niveles de la expresión genética y la expresión diferencial dentro y entre los grupos analizados.

### Metodología y enfoque:

Se recolectaron muestras de sangre periférica al momento 0, y nuevamente a las 8 semanas después de haber finalizado el estudio en el grupo de ASEA Redox. El ARN total fue extraído de cada muestra utilizando un kit de ARN de Sangre de PAXgene de PreAnalytix. Después de la extracción del ARN, cada muestra se concentró por precipitación para reducir el ARN de la globina utilizando el kit Thermo Fisher GLOBINclear para evitar la interferencia de excesivas transcripciones de globina. Resumen del Estudio del Suplemento de ASEA Redox transcripciones QR# 31790/1 y QR# 32541/1. Después, las muestras reducidas de globina fueron procesadas con el kit Affymetrix GeneChip 3 'IVT PLUS, seguidas de la hibridación con Affymetrix PrimeView Array, que contiene 49,395 matrices de sondeos a través de todo el genoma humano. La matriz fue analizada y se generaron los archivos (.cel, .chp, .arr) para permitir el análisis de la expresión diferencial entre los momentos determinados. La valoración de control de calidad fue evaluada con el software Affymetrix Expression Console v 1.4 Enero de 2017 y los cambios en los niveles de expresión fueron evaluados con el software Affymetrix Transcriptome Analysis v 3.0. Los genes que muestran un cambio en la expresión sobre la información inicial en el grupo de prueba (grupo A) y que no se observaron en el grupo de placebos (grupo B), o en el grupo de control (grupo C), se identificaron como posibles genes de interés. Además de eso, se examinó la expresión diferencial entre las muestras del grupo A de la semana 8 y las del grupo B de la semana 8. Se examinaron exhaustivamente los genes de interés para detectar posibles conexiones de trayectorias utilizando dos aplicaciones web: Wikipathways y PANTHER. Finalmente, se examinaron los genes de interés para determinar los niveles de expresión a las 8 semanas después de que el grupo de prueba consumiera ASEA Redox (experimento de lavado).

### Resultados:

#### Calidad del ARN:

La calidad del ARN fue determinada después de la preparación final de las muestras seleccionadas para el análisis. Las concentraciones de ARN y los rendimientos de las muestras fueron determinados mediante espectrofotometría UV (Nan-

odrop 1000, software ND-1000 v 3.8.1). Se determinó una estimación de pureza con espectrofotometría UV, midiendo las proporciones de absorción A260 / A280. Además, se analizaron las muestras en un Bioanalizador Agilent 2100, utilizando el software experto 2100 (vB.02.07.S153) para estimar la integridad mediante el examen de la traza electroforética completa del ARN. Se generó un Número de Integridad del ARN estimado (RIN). Los números del RIN superiores a 6 sugieren que el ARN con integridad podría funcionar en el análisis de expresión posterior. Todas las muestras tenían un rendimiento suficiente, proporciones de 260/280 y números de integridad de ARN estimados para sugerir que eran adecuados para el análisis de expresión. No se eliminaron muestras del análisis posterior.

### Calidad del proceso posterior a la matriz:

Usando el software Expression Console, se generó un diagrama de bloques de intensidad celular de sondeos de registro para evaluar la calidad. Las distribuciones de intensidad del sondeo divergente, en relación con las otras matrices, podrían indicar que se debería eliminar una muestra del análisis. La intensidad del sondeo, por lo general, fue similar en todas las muestras en todos los momentos determinados, lo que implica una estratificación mínima de los experimentos. A partir de este análisis, se omitió un ARN participante de las comparaciones de abundancia de transcripciones posteriores. Este bajo rendimiento podría deberse a una calidad de ARN ligeramente más baja o debido a una mala hibridación con la matriz. Para los 11 sondeos identificados como expresados diferencialmente, el cambio de multiplicación se consideró en ASEA Redox vs Placebos y en Placebos al momento 0 vs Placebos de la semana 8 para identificar que la diferencia observada se debía a cambios en el grupo de prueba (Tabla 2). Estos valores produjeron cambios de multiplicación de +/- 0.2-0.3, lo que representa un cambio del 20-30% en la transcripción.

**Tabla 1. 11 genes (resaltados) indican la expresión diferencial en muestras de prueba del grupo A (ASEA Redox) de la semana 8 versus el grupo B de placebos de la semana 8 más todos los sondeos restantes en esos genes.**

| Símbolo Genético   | Cambio de Multiplicación (linear) | ANOVA p-value (A_WK8 vs. B_WK8) |
|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| KCTD12             | -1.06                             | 0.323863                        |
| KCTD12             | -1.21                             | 0.103912                        |
| KCTD12             | -1.21                             | 0.039723                        |
| KCTD12             | -1.06                             | 0.315231                        |
| KCTD12             | -1.08                             | 0.311953                        |
| DNAJC3             | -1.05                             | 0.508502                        |
| DNAJC3             | -1.2                              | 0.013674                        |
| DNAJC3             | -1.08                             | 0.180221                        |
| EGR1               | 1.22                              | 0.00051                         |
| EGR1               | 1.04                              | 0.184945                        |
| EGR1               | -1.05                             | 0.540634                        |
| EMB                | -1.25                             | 0.049527                        |
| PYROXD1            | -1.31                             | 0.044862                        |
| PYROXD1            | -1.11                             | 0.267704                        |
| WDR11              | -1.2                              | 0.026049                        |
| IRAK3              | -1.2                              | 0.054293                        |
| IRAK3              | -1.2                              | 0.016879                        |
| IRAK3              | -1.28                             | 0.020403                        |
| CCR10              | 1.2                               | 0.003348                        |
| CCDC126            | -1.05                             | 0.14749                         |
| CCDC126            | -1.22                             | 0.008698                        |
| CCDC126            | -1                                | 0.590658                        |
| IRAK3              | -1.09                             | 0.419533                        |
| PYROXD1            | -1.05                             | 0.077593                        |
| PYROXD1            | 1.02                              | 0.747469                        |
| WDR11              | -1.04                             | 0.434389                        |
| EGR1               | 1.07                              | 0.358741                        |
| EGR1               | 1                                 | 0.583142                        |
| EGR1               | 1.02                              | 0.852381                        |
| IGLV1-41; IGLV1-51 | 1.29                              | 0.03319                         |
| IGLV1-41           | 1.19                              | 0.015031                        |

**Tabla 2.** sondeos expresados diferencialmente en las muestras de prueba de ASEA Redox de la semana 8 versus muestras de Placebos de la semana 8 en comparación con el Momento 0 en los grupos de ASEA Redox y Placebos.

| Símbolo Genético   | Cambio de Multiplicación de ASEA Redox vs Placebos | Cambio de Multiplicación (lineal) de ASEA Redox al Momento 0 vs Semana 8 | Cambio de Multiplicación (lineal) de Placebos al Momento 0 vs Semana 8 |
|--------------------|--|--|--|
| KCTD12             | -1.21  | -1.17  | 1.1  |
| DNAJC3             | -1.2   | -1.21  | 1.11   |
| EGR1               | 1.22   | 1.4  | 1  |
| EMB                | -1.25  | -1.21  | 1.15   |
| PYROXD1            | -1.31  | -1.25  | 1.03   |
| WDR11              | -1.2   | -1.11  | -1.1   |
| IRAK3              | -1.2   | -1.26  | 1.06   |
| IRAK3              | -1.28  | -1.14  | 1.01   |
| CCR10              | 1.2  | 1.19   | 1.02   |
| CCDC126            | -1.22  | -1.32  | 1.09   |
| IGLV1-41; IGLV1-51 | 1.29   | 1.34   | 1.22   |

Hubo 5 sondeos (Tabla 2 en negritas) donde el cambio de multiplicación del Momento 0 a la semana 8 en el grupo Placebos fue menor a +/- 1.05 (5%), lo que sugiere que el cambio del 20-31% observado en la semana 8 del grupo de ASEA Redox se debió a diferencias en el cambio desde el momento 0. Un sondeo adicional en el gen IRAK3 estaba cerca de este límite. Estas combinaciones de genes/sondeos no se expresaron diferencialmente en un grupo de control ambiental (sin tomar ningún suplemento o placebo), aunque el tamaño de la muestra del grupo de control ambiental podría ser demasiado pequeño para evaluarlo realmente.

Es interesante observar que después de un período de lavado de 8 semanas, los cambios de transcripción observados no se mantuvieron más en el grupo de ASEA Redox (Tabla 3).

**Tabla 3.** El análisis de expresión compara la actividad de transcripción de ASEA Redox en 5 genes de interés de la semana 8, y el contraste del cambio de transcripción compara a la semana 8 con el estudio posterior de lavado de las 8 semanas con la transcripción de ASEA Redox al final del estudio con participantes que consumieron ASEA Redox.

| Símbolo Genético | Cambio de Multiplicación (lineal) de ASEA Redox a las 8 semanas vs Momento 0 | Cambio de Multiplicación (lineal) del Estudio Posterior de Lavado de ASEA Redox vs. Momento 0 |
|------------------|--|---|
| KCTD12           | -1.17  | 1.44  |
| EGR1             | 1.4  | -1.02   |
| PYROXD1          | -1.25  | 1.74  |
| IRAK3            | -1.14  | 1.53  |
| CCR10            | 1.19   | -1.43   |

El análisis de expresión de la muestra de ASEA Redox de la semana 8 vs la muestra del Estudio Posterior de Lavado de ASEA Redox indicó la misma tendencia que la muestra de ASEA Redox de la semana 8 frente al momento 0 (Tabla 4). La expresión diferencial marca una tendencia en la misma dirección al igual que la semana 8 en comparación con la información inicial.

**Tabla 4.** El análisis de expresión compara el cambio en la actividad de transcripción en 5 genes de interés a la semana 8 del estudio del consumo de ASEA Redox con el Momento 0 y el cambio en la actividad compara a la semana 8 del estudio con la conclusión de un período de lavado de 8 semanas.

| Símbolo Genético | Cambio de Multiplicación (lineal) de ASEA Redox a las 8 semanas vs. Momento 0 | Cambio de Multiplicación (lineal) de ASEA Redox a las 8 semanas vs estudio posterior de lavado de ASEA Redox |
|------------------|---|--|
| KCTD12           | -1.17   | -1.67  |
| EGR1             | 1.4   | 1.39   |
| PYROXD1          | -1.25   | -2.02  |
| IRAK3            | -1.14   | -1.67  |
| CCR10            | 1.19  | 1.54   |

Los datos de expresión diferencial de este experimento de seguimiento sugieren que el efecto de la bebida ASEA Redox no está presente en >8 semanas después de detener el consumo de la bebida. Esto puede ser concluido por los datos, contra la información inicial registrada, tendiendo hacia la dirección opuesta a la semana 8 de haber sido observada previamente, versus los datos de la información inicial registrada. En los cinco conjuntos de sondeos examinados, los que habían mostrado una regulación, presentaron una regulación de forma descendente vs la comparación posterior de la información inicial registrada, y a su vez, las muestras que mostraron una regulación descendente mostraron una regulación ascendente vs la comparación posterior de la información inicial registrada. El apoyo adicional para este hallazgo es evidente en la comparación de la semana 8 con la información posterior. En esta información, los cinco sondeos establecen toda la tendencia de forma similar de la semana 8 en comparación con la información inicial registrada. Si el conjunto de sondeos estaba regulado a la baja en la semana original 8, en comparación con la información posterior, también estaba regulado en la semana 8 en comparación con la información posterior y, a la inversa, si los datos originales estaban regulados, la información de la semana 8 en comparación con la información posterior, también estaba regulada. La confirmación de estos hallazgos puede ser respaldada por un mayor tiempo de estudio con grupos de participantes más grandes.

#### Información de Trayectorias y Genes:

PANTHER (sus siglas en inglés significan Análisis de Proteínas A Través de Relaciones Evolutivas) es un sistema de clasificación diseñado para catalogar proteínas (y sus genes) y así poder comprender las trayectorias de los genes mediante el análisis de alto rendimiento. Al usar el Análisis de la Trayectoria de Panther (v11.1), los cinco genes de interés tuvieron cinco objetivos es sus trayectorias. Los cinco objetivos en sus trayectorias involucraron tres genes, CCR10, EGR1 e IRAK3 (Tabla 5)

**Tabla 5.** Análisis de Trayectoria Panther

| Gen     | Trayectoria 1  | Trayectoria 2             | Trayectoria 3   |
|---------|--|---------------------------|---|
| CCR10   | Inflamación intervenida por quimioquinas y la trayectoria de señalización de citoquinas. |                           |   |
| EGR1    | Señalización estimulada por angiotensina II a través de proteínas G y beta-arrestin      | Mapa de señalización CCKR | Trayectoria receptora de la hormona liberadora de gonadotropina |
| IRAK3   | Trayectoria de señalización receptora de daños   |                           |   |
| KCTD12  | Ninguno  |                           |   |
| PYROXD1 | Ninguno  |                           |   |

**Tabla 6.** Análisis de WikiPathways

| Gen     | Trayectoria 1                                    | Trayectoria 2   | Trayectoria 3   | Trayectoria 4          | Trayectoria 5                            |
|---------|--|---|---|------------------------|--|
| CCR10   | Péptido GPCRs                                    | GPCR, Clase A como la rodopsina   | Trayectoria de Señalización de Quimiocinas                    | Ligand binding de GPCR | Señalización transformadora de GPCR      |
| EGR1    | Receptor de Serotonina 4/6/7 y Señalización NR3C | Trayectoria de señalización del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) | Genes relativos del ritmo circadiano                          | Trayectoria NRF2       | Trayectoria de señalización VEGFA-VEGFR2 |
| IRAK3   | Trayectoria de Señalización Interleukin-1        | Regulación de daños como la trayectoria receptora de señalización               | MyD88: Sucesión "tipo mal" iniciada en la membrana plasmática |                        |  |
| KCTD12  | Ninguno  |   |   |                        |  |
| PYROXD1 | Ninguno  |   |   |                        |  |

**Conclusiones:**

El análisis primario no reveló ningún cambio significativo de +/- 2 veces con valores-p significativos. El análisis adicional identificó al menos 5 genes que pueden tener una expresión diferencial interesante en el grupo de prueba y que no fueron significativos en los grupos de placebos o de control al comparar la expresión de referencia con la expresión de la semana 8. El análisis de las trayectorias reveló varias trayectorias genéticas que podrían ser investigadas más a fondo. La confirmación de estos hallazgos puede ser comprobada por un mayor tiempo de estudio con grupos más grandes de participantes. Además, la recopilación y el análisis de la expresión de los sujetos de ASEA Redox a las 8 semanas o más a partir de que se detuvo el consumo de suplementos, proporciona datos interesantes sobre la duración del tiempo en que el suplemento podría tener efectos. Esta información sugiere que el uso continuo del suplemento de ASEA Redox es requerido para mantener la modulación continua del perfil de transcripción.