

## Informe para ASEA sobre resultados experimentales - in vitro

### Mejora antioxidante y reducción del estrés oxidativo 2009

#### ***Propósito:***

Este documento informa a ASEA los resultados de las pruebas in vitro realizadas entre febrero y marzo de 2009. Las células vivas en placas de cultivo se expusieron a ASEA y a la bioactividad con respecto a la actividad antioxidante del glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD), así como se midió el aumento en la producción nativa de estos antioxidantes dentro de las células. Además, se realizaron pruebas para determinar si el estrés oxidativo se redujo en las células y si la exposición a ASEA aumentó la viabilidad celular.

#### ***Métodos experimentales para la actividad antioxidante:***

Las células se cultivaron en varios platos con un medio de crecimiento de suero bovino. Como medida principal, se cultivaron células de tipo epitelial de ratón (estas células reaccionan de manera similar a las células humanas) y luego se usaron células endoteliales humanas para obtener resultados cuantitativos relevantes.

En las pruebas de mejora de antioxidantes, algunos de los cultivos celulares se expusieron a ASEA y otros cultivos a la misma cantidad de una solución salina tamponada con fosfato inerte (PBS). La actividad antioxidante de las células en cada una se midió mediante un kit comprado, kit Array Design Stressgen (# 900-158 para actividad GPx y # 900-157 para actividad SOD). Los reactivos químicos dentro de estos kits miden la capacidad de los

antioxidantes en los extractos celulares para reducir la actividad oxidante que ocurre naturalmente cuando se agregan ciertos químicos biológicos oxidantes.

Debido al hecho de que algunas de las moléculas reactivas en ASEA podrían reaccionar e interferir con algunos de los agentes químicos en estos kits, se realizaron varios experimentos preliminares para examinar la precisión de los resultados en función de los estándares conocidos de actividad antioxidante y se realizaron ajustes.

***Resultados de las pruebas de actividad antioxidante:***

Los primeros resultados obtenidos mostraron efectos grandes y bien definidos. Los extractos celulares expuestos a ASEA exhibieron ocho (8) veces la eficacia antioxidante para GPx que aquellos expuestos al PBS inerte. La eficacia antioxidante de SOD fue ligeramente menor, con aproximadamente 5 veces mejoras en la eficiencia. Es de destacar que esta eficiencia fue evidente especialmente a bajas concentraciones de ASEA, probadas hasta el 2.5% de la resistencia total. El aumento de la concentración de ASEA a altas concentraciones no aumentó notablemente la eficacia antioxidante; por lo tanto, parece haber un umbral de saturación muy bajo a bajas concentraciones de GPx. Se necesitaría más experimentación a concentraciones muy bajas de ASEA para comprender completamente la dependencia de la concentración.

Es seguro decir que se observó al menos una mejora del 500% en la eficiencia antioxidante general durante estas pruebas preliminares in vitro debido a la exposición a ASEA.

### ***Métodos experimentales para la regulación positiva de antioxidantes:***

En estos experimentos, algunas células endoteliales humanas cultivadas fueron expuestas a ASEA y otras solo a una solución tampón de fosfato inerte (PBS). El análisis estándar de Western Blot en todas las células se realizó para determinar si la exposición a ASEA activó el núcleo para exigir una mayor producción de antioxidantes, como GPx. Las concentraciones de factores de transcripción (mensajeros) en el núcleo que requieren regulación positiva de antioxidantes también se midieron en células endoteliales humanas y se compararon con células que no había estado expuesto a ASEA.

El movimiento de los factores de transcripción en el núcleo se puede ver con ciertos colorantes bajo un microscopio y, por lo tanto, ofrece una forma de ver el llamado a la regulación positiva de los antioxidantes sin algunos de los obstáculos presentados por el uso de células endoteliales.

Dado que la producción de antioxidantes también se puede regular por la exposición de las células a ciertos niveles bajos niveles de toxinas inflamatorias, se realizaron pruebas para asegurarse de que ASEA no estaba provocando que las células sufrir esta respuesta inflamatoria o tóxica de bajo nivel.

### ***Resultados para la regulación ascendente de antioxidantes:***

Los resultados de estas pruebas fueron extraordinarios en varios aspectos. Primero, hubo una verdadera regulación al alza de producción antioxidante en células expuestas a ASEA. Este efecto fue temporal, durando solo alrededor de 120 minutos pero fue

claramente visible. El resultado más interesante, sin embargo, es que la exposición a ASEA en cualquier la concentración no invocó el factor de transcripción inflamatorio normal (NF-kappaB) y, sin embargo, lo hizo invocar el factor de transcripción antioxidante (NRF2). Estimulando la producción de antioxidantes sin La estimulación de la inflamación de bajo nivel es muy rara y ha despertado cierto interés en la investigación de la comunidad científica.

Las pruebas que midieron el movimiento de los factores de transcripción fueron pruebas controladas, tenían "Controles positivos" que mostraron que la prueba estaba funcionando. Por ejemplo, una pequeña cantidad de una toxina que se sabe que causa la respuesta inflamatoria (movimiento del factor de transcripción NF-kappaB) fue probado junto con ASEA, se observó una respuesta positiva muy claramente con la toxina y no se observó respuesta con ASEA. Con el factor de transcripción antioxidante NRF2, positivo el movimiento de este factor de transcripción se observó tanto en ASEA como en el control positivo. Cientos de células se observaron para obtener estos resultados.

Estos resultados también fueron verificados por el análisis de Western Blot que muestra respuestas claras en el aumento de antioxidantes tras la exposición a ASEA en relación con el control de solución salina.