



Listas de contenidos disponible en ScienceDirect

Toxicología química y de alimentos**La protección antioxidante de CELLFOOD® contra el daño oxidativo *in vitro***Serena Benedetti ^{a,*}, Simona Catalani ^a, Francesco Palma ^b, Franco Canestrari ^a^a Universidad de Urbino “Carlo Bo”, Departamento de Ciencias Biomoleculares, Sección de Bioquímica Clínica, Via Ubaldini 7, 61029 Urbino (PU), Italia^b Universidad de Urbino “Carlo Bo”, Departamento de Ciencias Biomoleculares, Sección de Bioquímica y Biología Molecular, Via Saffi 2, 61029 Urbino (PU), Italia**INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO**

Historial del artículo:

Recibido el 16 de Abril de 2011

Aceptado el 4 de Junio de 2011

Disponible en la red desde el 14 de Junio de 2011

Palabras clave:

CELLFOOD®

Suplemento nutricional

Daño Oxidativo

Protección antioxidante

Eritrocitos

ADN

RESUMEN

CELLFOOD® (CF) es un suplemento nutricional innovador que contiene 78 elementos traza iónicos/coloidales y minerales, combinados con 34 enzimas y 17 aminoácidos, suspendido todo ello en una solución de sulfato de deuterio. El objetivo de este estudio era el de investigar, por primera vez, las propiedades antioxidantes de CF *in vitro* dentro de diferentes modelos.

Se eligieron tres elementos oxidantes a nivel patológico y fisiológico, para valorar la protección de CF frente al estrés oxidativo: peróxido de hidrógeno, radicales peróxilos y ácido hipocloroso. Tanto las biomoléculas (GSH y ADN plasmídico) como las células circulantes (eritrocitos y linfocitos) fueron utilizadas como objeto de la oxidación.

CF protegió de la oxidación, en función de la dosis, tanto el GSH como el ADN, preservando grupos reducidos de GSH tiol y la integridad del ADN superdesarrollado, respectivamente. Al mismo tiempo, CF protegió los eritrocitos de los daños producidos por la oxidación, al disminuir la lisis celular y la reducción intracelular del GSH, después de la exposición de los mismos, ante los agentes oxidantes. En los linfocitos, CF redujo el estrés oxidativo intracelular provocado por los tres oxidantes, en función de la dosis.

La protección total *in vitro* de biomoléculas y células, frente a las agresiones de radicales libres, sugiere que CF puede ser una válida ayuda en la prevención y tratamiento de varias condiciones patológicas y fisiológicas, relacionadas con el estrés oxidativo, desde el envejecimiento hasta la aterosclerosis, desde la degeneración del sistema nervioso, hasta el cáncer.

© 2011 Elsevier Ltd. Todos los derechos reservados.

Abreviaturas: AAPH, 2,2'-azobis(2-amidinopropano) clorhidrato; BAP, antioxidante biológico potencial; CF, CELLFOOD®, DCFH-DA, 2',7'-diclorofluorescina diacetato; DTNB, 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico; GSH, glutatión; Hb, hemoglobina; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; HOCl, ácido hipocloroso; mtADN, ADN mitocondrial; NaOCl, hipoclorito de sodio; PBS, solución salina tamponada con fosfato; RBC, eritrocitos; ROS (ERO), especies reactivas de oxígeno.

*Autor para correspondencia.

Tel.: +39 0722 351477; fax: +390722322370.

Dirección E-mail: serena.benedetti@uniurb.it (S. Benedetti),simonacatalani@yahoo.it (S. Catalani),francesco.palma@uniurb.it (F. Palma),franco.canestrari@uniurb.it (F. Canestrari).

0278-6915/\$ - véanse páginas preliminares © 2011 Ltd.

Todos los derechos reservados.

Doi:10.1016/j.fct.2011.06.029

1. Introducción

El incremento del estrés oxidativo describe, generalmente, una condición donde las defensas antioxidantes de las células son inadecuadas para bloquear, por completo, los radicales libres generados por una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS / ERO), pérdida de defensas antioxidantes o ambas cosas (Halliwell y Gutteridge, 1999). Una de las consecuencias mayores del estrés oxidativo es el daño provocado a los ácidos nucleicos, a los lípidos y a las proteínas, que puede comprometer severamente la salud y la viabilidad de las células, provocando finalmente la muerte de las células y el desarrollo de la enfermedad (Dalle-Donne et al., 2006).

Entre las macromoléculas, el ADN mitocondrial (mtADN) está muy expuesto a las ROS producidas por una filtración de electrón durante la fosforilación oxidativa (Yakes y Van, 1997). Además, se cree que es más susceptible al daño oxidativo que el ADN nuclear (nADN) debido a la falta de histonas (Dizdaroglu et al., 1991; Ljungman y Hanawalt, 1992) y a la vulnerabilidad/insuficiencia de los procedimientos de reparación mitocondrial (Bohr, 2002; Graziewicz et al., 2002). Como consecuencia, el daño oxidativo producido al mtADN puede provocar una pérdida del potencial de la membrana, una reducida síntesis de ATP (Trifosfato de Adenosina) y la destrucción de las células (Van Houten et al., 2006). Un creciente número de pruebas sugiere que el estrés oxidativo y el daño oxidativo en el mtADN, derivan en mecanismos pato-fisiológicos, primarios o secundarios de múltiples enfermedades, agudas o crónicas como aterosclerosis, degeneración del sistema nervioso y cáncer (Wallace, 1999; Cohen y Tong, 2010; Galasko y Montine, 2010; Ziech et al., 2010).

En los últimos años, el enfoque terapéutico tradicional hacia estas enfermedades, se ha abierto progresivamente a la contribución de suplementos antioxidantes, especialmente a los que derivan de fuentes naturales que tienen una biodisponibilidad más alta y, por esto, una mejor eficacia protectora que los antioxidantes sintéticos (Berger, 2005; Fusco et al., 2007; Herrera et al., 2009). Enfocando nuestra atención en las fuentes naturales y biodisponibles de antioxidantes, hemos tomado en consideración un suplemento nutricional, llamado CELLFOOD® (CF) (Nu Science Corporation, CA, USA), una fórmula patentada de alta concentración, que contiene 78 elementos traza iónicos/coloidales y minerales, combinados con 34 enzimas y 17 aminoácidos, todo suspendido en una solución de sulfato de deuterio (Dyer, 2000).

Un primer indicio hace que CF parezca potencialmente interesante, como suplemento natural para la protección antioxidante, frente al daño derivado del estrés oxidativo. Primero, la eficacia de CF se ha evidenciado en los tratamientos de fibromialgia (Nieddu et al., 2007), síndrome de dolor crónico sin cura efectiva (Smith y Barkin, 2010). Entre las diferentes hipótesis para su etiopatología, el estrés oxidativo, generado por la disfunción mitocondrial, es una de las posibilidades (Pieczenik y Neustadt, 2007; Cordero et al., 2010), indicando que un suplemento con antioxidantes puede ser importante para modular los efectos de las ROS en el síndrome de fibromialgia. Por consiguiente, se ha demostrado que el suplemento oral de CF durante un periodo de seis meses, mejora significativamente los síntomas de la fibromialgia y la calidad de vida relacionada con la salud, de los pacientes que padecen fibromialgia, en comparación con el efecto placebo reafirmando, de esta manera, la función de CF como una notable fuente de antioxidantes (Nieddu et al., 2007).

En segundo lugar, la eficacia de CF se ha demostrado en atletas profesionales (Milic y Djordjevic, 2009). Es bien conocido que durante el ejercicio intenso, el consumo de oxígeno aumenta notablemente y hay una mayor

producción *in vivo* de ROS debido al incremento del metabolismo celular y a la activación de los glóbulos blancos (Santos-Silva et al., 2001). Al no ser neutralizados con rapidez, los radicales libres alteran la permeabilidad y la funcionalidad de las membranas musculares, generando así un declive de la prestación y una recuperación más lenta; al mismo tiempo, puede darse un estado de anemia por la hemólisis oxidativa de los eritrocitos (Robinson et al., 2006). Muy interesante también, la demostración de que la suplementación con CF tiene efectos positivos en el proceso de entrenamiento/adaptación y en la prestación deportiva de ciclistas profesionales (Milic y Djordjevic, 2009), probablemente a través de mecanismos que incluyen una protección antioxidante contra los daños oxidativos, relacionados con el ejercicio.

Con el objetivo de llenar el vacío que existe en la literatura sobre los mecanismos que subyacen a la función protectora de este suplemento nutricional, en este estudio investigamos las propiedades antioxidantes de CF *in vitro*, valorando su acción protectora frente a tres oxidantes relevantes a nivel patológico y fisiológico, tales como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radicales peróxilos (ROO) y ácido hipocloroso (HOCl). Es bien conocido que, a niveles fisiológicos (1 – 10 µM extracelular), H₂O₂ aumenta la proliferación de las células y tiene la función de “avisar”; por lo contrario, en concentraciones más altas H₂O₂ provoca estrés oxidativo, oxidación y daño del ADN y como consecuencia, mutagénesis y apoptosis (Song et al., 2007). De forma similar, los radicales peróxilos son importantes intermediarios que contribuyen, de forma significativa, a producir estrés oxidativo determinado por radicales libres, al tener la peculiaridad de provocar reacciones en cadena y lipoperoxidación provocando, así, cambios estructurales y haciendo que la membrana pierda su integridad (Kannan y Jain, 2000). Finalmente, HOCl es un oxidante biológico altamente reactivo, que tiene un papel importante tanto en la destrucción de células bacterianas, como en las heridas del tejido inflamatorio por medio de los neutrófilos (Winterbourn, 2002). Una excesiva producción de HOCl (hasta 200 µM en condiciones patológicas) tiene efectos tóxicos; de hecho, HOCl tiene la facultad de penetrar en las membranas celulares y de reaccionar con una amplia gama de moléculas blanco (lípidos, proteínas y ADN). El glutatión reducido es uno de los sustratos biológicos preferidos por el ácido hipocloroso (HOCl) (Winterbourn y Brennan, 1997).

Teniendo en cuenta todo esto, el efecto protector de CF frente al daño oxidativo, se ha investigado en diferentes sistemas modelo, eligiendo, sean las biomoléculas (glutatión y ADN) que las células circulatorias (eritrocitos y linfocitos), como objeto de la oxidación.

2. Material y métodos

2.1 Reactivos

CELLFOOD® (líquido) ha sido proporcionado, amablemente por Eurodream (La Spezia, Italia) y almacenado a temperatura ambiente (CF se mantiene estable durante años en estas condiciones); Lymphoprep™ ha sido adquirido en Fresenius Kabi (Oslo, Noruega); 2,2' – azobis(2-amidinopropano) clorhidrato (AAPH) como generador de los radicales peróxidos, se ha adquirido en Trimital (Milán, Italia); 2',7' – dichlorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), glutatión (GSH) e hipoclorito de sodio (NaOCl) en Sigma-aldrich (Milán, Italia).

2.2 CELLFOOD® poder antioxidante

El poder antioxidante de CF ha sido medido por el test de BAP (Antioxidante Biológico Potencial) (Diacron International, Grosseto, Italia). El método está basado en la capacidad que tiene una solución colorada - que contiene iones férricos (Fe³⁺) dirigidos adecuadamente, a un

específico sustrato cromogénico - de perder color cuando sus iones Fe^{3+} se reducen a iones ferrosos (Fe^{2+}), por la incorporación de un sistema reductor (Benzie y Strain, 1996). La intensidad de la decoloración se establece fotométricamente a 505 nm; los coeficientes de variación "intra assay" e "inter assay" son menores del 5,5%.

2.3 Protección de los grupos tiól contra la oxidación

Como se ha descrito anteriormente (Solarska y al., 2010), una solución de GSH (250 μ M, final) en una solución salina tamponada con fosfato, (PBS, pH 7.4) se ha mezclado en presencia o ausencia de CF en diferentes diluciones, con oxidantes tales como 100 μ M H_2O_2 , 10 mM AAPH o 125 μ M HOCl (concentraciones finales) para llegar a un volumen de 500 μ l.

HOCl se añadió en una solución de NaOCl en PBS; en efecto, en un pH 7.4, esta solución contiene una mezcla de HOCl y OCl en una proporción de 1:1 aproximadamente y, posteriormente, es denominada HOCl (Vissers et al., 1998). Las concentraciones de H_2O_2 y HOCl fueron determinadas por espectrofotometría, a 230 nm ($\epsilon = 71 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 292nm ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) respectivamente (Maehly y Chance, 1954; Morris, 1966).

Después de una incubación de 15 min. a temperatura ambiente (HOCl) o después de una hora de incubación a 37° C (H_2O_2 , AAPH), las muestras fueron diluidas con 1 ml. de tampón de fosfato 0.1 M, pH 8.0, y mezcladas con 10 μ L. De 10 mM DTNB. La absorción de ácido tionitrobenzóico se midió a 412 nm.

2.4 Protección del ADN contra los daños oxidativos

Para evaluar el efecto protector de CF contra la oxidación del ADN, se ha utilizado un sistema libre de células, compuesto por ADN plasmídico cuya estructura se asemeja a la del mtADN. El plásmido PINCO (Grignani et al., 1998) y el pUC18 se propagaron con arreglo a las técnicas moleculares estándares (Sambrook et al., 1989).

El ADN plasmídico fue purificado a través del kit Midi plasmídico QIAGEN. El plásmido purificado fue testado por espectrofotometría y diluido en TE (10mM Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM Na₂EDTA) hasta una concentración de 1 mg/mL. El pUC18 fue linealizado con Eco RI "overnight" a 37°C, y posteriormente fue purificado usando el Kit Mini plasmídico QIAGEN y diluido en TE hasta una concentración de 0.5 mg/mL.

Después de la purificación, 10 μ L de ADN plasmídico PINCO (0.025 mg/mL) en PBS, conteniendo pUC18 lineal (0.01 mg/mL) como patrón interno, se mezclaron con 10 μ L de PBS o 10 μ L de distintas diluciones de CF en PBS (escala 1:1250-1:25, final) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, 1 μ L de 100 mM AAPH (5mM concentración final) todavía frescos, se emplazaron a lo largo de las paredes del tubo. El tubo fue centrifugado y encubado a una temperatura de 37°C durante 10 minutos. 15 microlitros de la reacción se mezclaron con 5 μ L de un Tampón de Carga 5x y analizados en un gel de agarosa Tris-Acetato EDTA (TAE) y sometidos a electroforesis durante 45 minutos a 75 V. El gel se tinto con "GelRed Nucleic Acid Gel Stain" (Biotium, USA) y visualizado por luz ultra violeta en un "Gel Doc 200" (Bio-Rad). La cuantificación se hizo a través de un análisis de densitometría usando un Software Quantity One 4.01 (Bio-Rad). El daño oxidativo fue determinado en función de la disminución del nivel de la forma superenrollada del ADN plasmídico.

Se adoptó el mismo procedimiento para los otros sistemas generadores de ROS en los cuales AAPH fue reemplazado con 1 μ L de 20 mM H_2O_2 + 2mM citrato férrico (Fe^{3+} , 100 μ M; H_2O_2 , 1mM, concentraciones finales) o bien 1 μ L de 60 μ M $FeSO_4$ + 112 μ M de N^2EDTA , pH 8.0 + 2mM H_2O_2 (Fe^{2+} , 3 μ M; EDTA, 5.6

μ M; H_2O_2 , 100 μ M, concentraciones finales) ó 1 μ L de HOCl 4 mM (200 μ M concentración final).

2.5 La protección de los eritrocitos frente a la hemólisis inducida por los oxidantes y la depleción del glutatión.

Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada, por parte de voluntarios sanos que dieron su consentimiento, a través de transfusiones de sangre. Como lo dicho anteriormente (Benedetti et al., 2004) los eritrocitos (RBC) fueron aislados a través de centrifugación a 2.500 r.p.m. (revoluciones por minuto) durante 10 minutos, lavados dos veces con PBS y posteriormente puestos en resuspensión, usando el mismo tampón hasta un nivel de hematocrito del 5%. La suspensión de RBC fue incubada posteriormente a 37°C en presencia o ausencia de CF, con diferentes diluciones, con 100 μ M H_2O_2 10 mM AAPH o 125 μ M HOCl (concentraciones finales). Se añadió CF a la suspensión RBC, diez minutos antes de la agregación de los agentes oxidantes. La suspensión de eritrocitos incubada con PBS sirvió de control. En el tiempo indicado, una parte de la mezcla de la reacción (1 mL) fue removida y centrifugada. La hemólisis de los RBC se evaluó midiendo el contenido de hemoglobina (Hb) en los sobrenadantes a 540 nm, mientras los niveles de GSH se determinaron a 412 nm por análisis volumétrico con DTNB, después de que se añadiera agua destilada a los pellets (material sedimentado) de RBC para provocar la lisis a las células.

2.6 Protección de los linfocitos frente a la formación de ROS

Se obtuvieron muestras de sangre heparinizada, por parte de voluntarios sanos que dieron su consentimiento, a través de transfusiones de sangre. Se aislaron los linfocitos por medio de la centrifugación a 1.500 r.p.m. durante 20 minutos en presencia de Lymphoprep TM, lavado dos veces con PBS y después resuspendido en el mismo tampón en una concentración de 1×10^6 (10 a la sexta potencia) células/mL. Las células fueron incubadas con DCFH-DA (25 μ M, final) a 37°C durante 30 minutos (Myhre et al., 2003); el exceso de la prueba fue, posteriormente, removido por medio de la centrifugación. Especies de oxígeno reactivo (ROS) intracelular se detectaron en linfocitos cargados con DCFH-DA incubados a 37°C en presencia o ausencia de CF, con diluciones diferentes, con 100 μ M H_2O_2 , 10 mM AAPH ó 125 μ M HOCl (concentraciones finales). Se añadió CF a la suspensión de linfocitos 10 minutos antes de la agregación de los agentes oxidantes. Muestras de 5×10^4 (10 a la cuarta potencia) células fueron situadas en placas de 96; en el tiempo indicado, la emisión de fluorescencia de la prueba, después de la oxidación a través de ROS se midió a 520 nm a través de la excitación a 485 nm en un espectroscopio de fluorescencia FluoStar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Alemania).

2.7 Análisis de los datos

Todos los resultados presentados son valores medios +/- desviaciones estándares (SD) de tres experimentos independientes. Los gráficos se obtuvieron usando Origin 6.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA. USA).

3. Resultados

3.1 Poder antioxidante de CF

La evaluación de la capacidad de CF de reducir hierro, a través del test de BAP, como medida de su total poder antioxidante, reveló que CF tiene un valor BAP igual a 65,205 +/- 1676 μ M.

3.2 Protección de CF contra la oxidación de GSH

En los experimentos donde se ha empleado GSH como objeto de la oxidación, hemos encontrado que el H_2O_2 , el

AAPH y el HOCl provocaron una fuerte oxidación del grupo GSH tiol, determinando así una reducción significativa de la concentración de GSH en la mezcla de reacción (se observó una reducción aproximada al 70%, respecto al control. No se indican datos). Cuando la oxidación tuvo lugar en presencia de CF, con distintas diluciones (escala 1:5000-1:50), observamos que CF inhibió la oxidación de GSH inducida por los tres oxidantes en función de la dosis (Fig. 1). La mejor protección contra la oxidación de los grupos tiol, la observamos cuando se utilizó H₂O₂ como oxidante (IC₅₀ a dilución de CF igual a 1.385) en vez de AAPH (IC₅₀ a 1.140) o HOCl (IC₅₀ a 1:130).

3.3 La protección de CF contra la oxidación del DNA

El efecto protector de CF contra la oxidación del ADN se investigó en un sistema libre de células. El ADN plasmídico que no se oxidó (control) contenía 48 +/- 2% de forma superenrollada (CCC) y 50 +/- 2% de forma circular (OC); mientras que el ADN plasmídico, tratado con diferentes sistemas que generan ROS, mostró una disminución de, aproximadamente, el 33% de la forma CCC (no se indican datos). Cuando la oxidación, inducida por Fe²⁺/H₂O₂, Fe³⁺/H₂O₂ y AAPH, tuvo lugar en presencia de CF con distintas diluciones (escala 1:1250-1:25), se observó una inhibición, en función de la dosis, de la oxidación del ADN (Fig. 2). La mejor protección del ADN se evidenció cuando Fe²⁺/H₂O₂ fue empleado como oxidante (IC₅₀ con CF diluido a 1:909) en vez de Fe³⁺/H₂O₂ (IC₅₀ a 1:250) o AAPH (IC₅₀ a 1:84). Se encontró una tendencia distinta usando HOCl como agente oxidante; de hecho en las más altas diluciones testadas de CF (1:1250) se evidenció ya una protección contra el daño al ADN, del 100% (no se muestra).

3.4 La protección de CF contra la oxidación de RBC (eritrocitos)

En los experimentos en los que se han usado RBC como objeto de la oxidación, hemos encontrado que la oxidación causada por H₂O₂, AAPH y HOCl, provocó una lisis celular, en función del tiempo, hacia la liberación de Hb (hemoglobina) y el incremento de la absorción a 540 nm (Fig. 3A-C). Por lo contrario, los RBC incubados en PBS (controles) se mantuvieron estables y se observó una pequeña hemólisis durante los distintos periodos de incubación. Cuando se produjo la oxidación, a través de AAPH, en presencia de CF con distintas diluciones (escala 1:4000-1:500), se evidenció una reducción, en función de la dosis, de la hemólisis de los RBC (Fig. 3B). Cuando se produjo la oxidación inducida por H₂O₂ y HOCl, en presencia de CF con distintas diluciones (escala 1:4000-1:500), no se evidenció ninguna hemólisis de los RBC, más bien, la lisis celular fue incluso más baja que los controles (Fig. 3^a y C).

Al observar la oxidación a través de H₂O₂, AAPH y HOCl, se notó también una disminución intracelular, en función del tiempo, del GSH en los RBC incubados a 37°C (Fig. 4^a-C), mientras se evidenció un ligero consumo de GSH en los controles durante los distintos periodos de incubación. Cuando la oxidación del RBC tuvo lugar en presencia de CF a diferentes diluciones (escala 1:4000-1:500), se observó una inhibición en el desgaste del GSH en función de la dosis (Fig. 4A-C).

3.5 La protección de CF frente a la oxidación de linfocitos

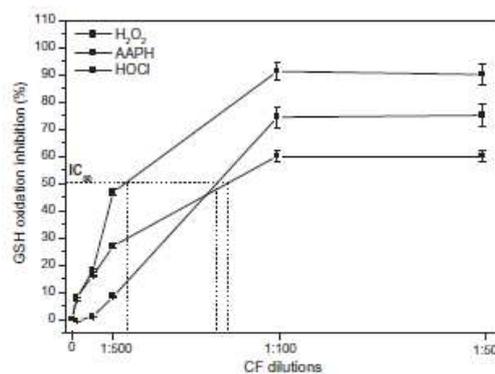
Se evidenció una pequeña emisión de fluorescencia en linfocitos, cargados de DCFH-DA, incubados con PBS

(controles); por lo contrario, la agregación de H₂O₂, AAPH y HOCl en los linfocitos, provocó una fuerte emisión de fluorescencia que indicaba una rápida acumulación de ROS intracelular (aproximadamente 5 veces más alta que en el control; no se muestran datos). Cuando la oxidación tuvo lugar en presencia de CF a diferentes diluciones (escala 1:2000-1:250) se evidenció una reducción, dependiente de la dosis, del estrés oxidativo en las células, con una inhibición de la formación de las ROS igual al 100%, en las concentraciones más altas de CF, entre las que fueron testadas (Fig. 5). La mejor protección de CF frente a la acumulación de las ROS, se observó cuando se utilizó AAPH como oxidante (IC₅₀ con CF diluido a 1:647) en vez de HOCl (IC₅₀ a 1:500) o H₂O₂ (IC₅₀ a 1:483).

4. Debate

En este estudio, las propiedades antioxidantes *in vitro* de CELLFOOD® se investigaron por primera vez. El primer análisis de CF (líquido) realizado, implicó una evaluación de su facultad para reducir hierro, como medida de su poder total antioxidante. Como resultado, descubrimos que CF tenía un valor de BAP aproximadamente de 65.000 µM; esto significa que CF tiene una capacidad antioxidante muy alta, considerando que el plasma del ser humano, en personas que gozan de buena salud, tiene un valor de BAP que oscila entre 2.200 y 4.000 µM (Martarelli y Pompei, 2009). Naturalmente este poder no es absoluto, sino relativo al sustrato que se está analizando (iones férricos). Sin embargo, considerando que estos iones son componentes que surgen de forma natural, hemos considerado que el test de BAP proporcionó una medida fiable del poder antioxidante de CF frente a las agresiones de los radicales libres, en condiciones fisiológicas.

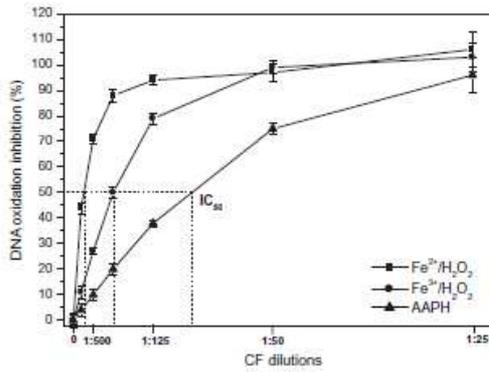
Inhibición de la oxidación del GSH (%)



Diluciones de CF

Fig. 1. La protección del GSH frente a la oxidación de los grupos tiol, inducida por H₂O₂, AAPH, y HOCl a través de CELLFOOD®. El GSH (250 µM) fue incubado con 100 µM H₂O₂, 10 mM AAPH ó 125 µM HOCl (final) en ausencia y presencia de CF (escala de dilución 1:5000-1:50). Los datos reflejan la media +/- SD de los tres experimentos.

Inhibición de la oxidación del ADN (%)



Diluciones de CF

Fig. 2. La protección del ADN frente a la oxidación inducida por H₂O₂ y AAPH a través de CELLFOOD®. El ADN plasmídico Pinco (0.025 mg/mL) fue incubado con Fe²⁺/H₂O₂, Fe³⁺/H₂O₂ o AAPH en ausencia y presencia de CF (escala de dilución 1:1250-1:25). Los datos reflejan la media +/- SD de los tres experimentos.

Teniendo esto en cuenta, decidimos investigar la protección antioxidante de CF frente a tres agentes oxidativos relevantes, a nivel fisiológico, como el peróxido de hidrógeno, los radicales peróxidos y el ácido hipocloroso, empezando con el GSH como molécula objeto de la oxidación. Como resultado hemos observado que CF inhibió la oxidación del GSH inducida por los tres oxidantes, en una medida dependiente de la dosis, manteniendo, así, los grupos tiól del GSH en su estado reducido. El GSH es el más abundante de los antioxidantes no enzimáticos, presentes en las células de los mamíferos y juega un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis del redox (*reducción de la oxidación*) celular (Pastore et al., 2003). Durante el estrés oxidativo, la reserva celular del GSH disminuye; como consecuencia, neutralizadores de radicales, como CF, de procedencia exógena, pueden proteger los niveles de GSH en las células, impidiendo que se consuman en reacciones con radicales libres (Valko et al., 2007).

También hemos evaluado el efecto protector de CF frente al daño producido en el ADN por los radicales libres, usando un sistema libre de células compuesto por ADN plasmídico que tiene una estructura similar a la del mtADN. Nuestros experimentos indican que CF protege ampliamente frente a la oxidación del ADN, especialmente cuando está inducida por el sistema de generación de radicales Fe²⁺/H₂O₂. Estas especies de radicales (radicales hidróxidos) se producen, sobre todo, en la mitocondria (Lenaz, 1998) y se ha demostrado que el daño oxidativo al mtADN está conectado con el envejecimiento fisiológico y con los trastornos relacionados con la edad, como por ejemplo, los trastornos degenerativos esporádicos, la diabetes tipo 2, cáncer y enfermedades cardíacas (Balaban et al., 2005; Taylor y Turnbull, 2005). Nuestros resultados indican que el suplemento de CF puede jugar un papel en la viabilidad mitocondrial y que la toma prolongada de CF puede ayudar en las enfermedades relacionadas con la disfunción mitocondrial. Por lo tanto, el uso de CF en pacientes con fibromialgia demostró una mejoría en los síntomas de la fibromialgia y en la calidad de vida, relacionada con la salud (Nieddu et al., 2007).

Otro aspecto que surgió del ensayo clínico sobre la protección del ADN, fue el comportamiento del CF en relación con la oxidación mediada por HOCl. HOCl provoca diferentes tipos de daños en el ADN (daños a una única cadena, formación de 8-OHdG y M1dG) (Gungor et al., 2010) y nuestros datos revelaron que CF ejerció un alto

nivel de protección contra los daños a una única cadena del ADN. Es bien sabido que HOCl producido por neutrófilos activados, puede dar inicio a una mutagénesis química y a una carcinogénesis al producir un daño oxidativo al genoma, en el entorno inflamatorio (Ohshima et al., 2003).

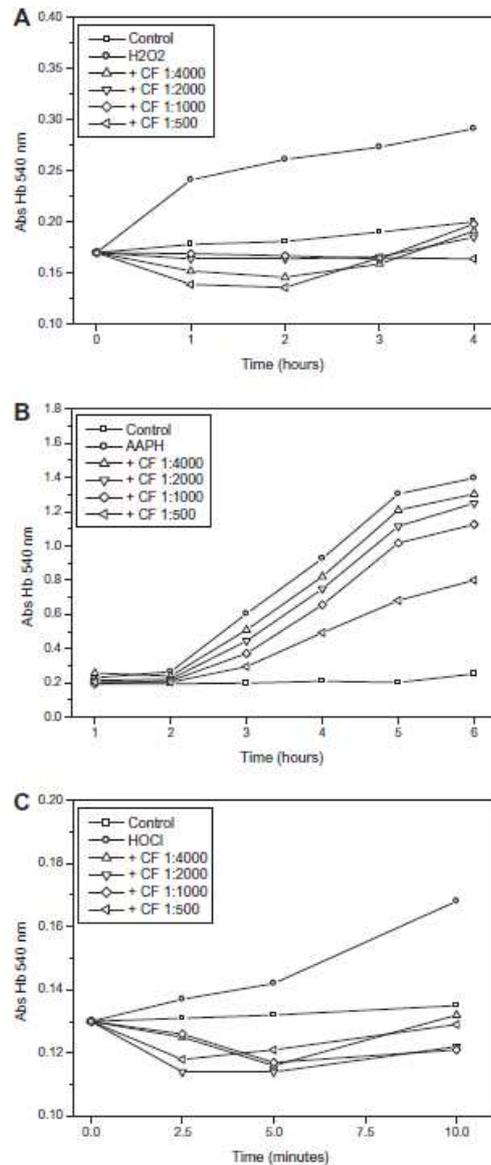


Fig. 3. La protección de los eritrocitos frente a la hemólisis inducida por H₂O₂ (A), AAPH (B) y HOCl (C) a través de CELLFOOD®. Los eritrocitos fueron incubados en PBS con 100µM H₂O₂ a 37°C durante 4 horas (A), con 10 mM AAPH durante 6 horas (B) o con 125 µM HOCl durante 10 minutos (C) tanto en ausencia como en presencia de CF (escala de dilución 1:4000-1:500). Los datos reflejan la media de tres experimentos (se han omitido los SD para mejor comprensión).

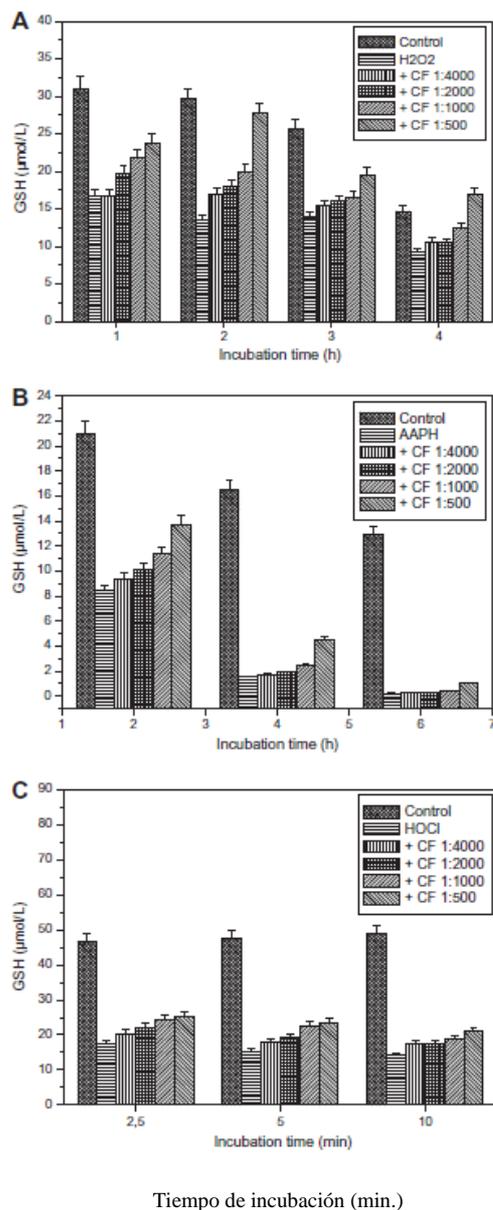


Fig. 4. La protección de los eritrocitos contra la disminución del GSH inducida por H₂O₂ (A), AAPH (B) y HOCl (C), a través de CELLFOOD®. Los eritrocitos fueron incubados en PBS con 100 μM H₂O₂ a 37°C durante 4 horas (A), con 10 mM AAPH durante 6 horas (B) o con 125 μM HOCl durante 10 minutos (C) tanto en ausencia como en presencia de CF (escala de dilución 1:4000-1:500). Los datos reflejan la media +/- SD de los tres experimentos.

En efecto, la activación de neutrófilos en la inflamación de los pulmones, se puede considerar como un significativo factor en genotoxicidad, hacia las células epiteliales (Gungor et al., 2010). El estrés "chlorinative" está relacionado, también, con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el parkinson y la esclerosis múltiple, enfermedades en las que el papel de la inflamación está sujeto a una mayor observación (Yap et al., 2007). Los resultados del presente estudio revelan que CF muestra una protección activa del genoma y esta protección puede ser utilizada en medicina preventiva y en casos de patologías crónicas y degenerativas, en las cuales se sabe que los estados inflamatorios juegan un papel etiológico.

Inhibición de la formación ROS (%)

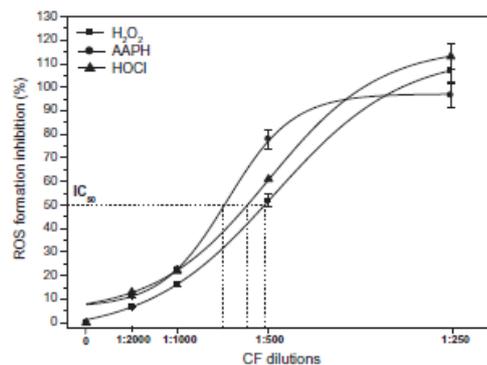


Fig. 5. La protección de los linfocitos frente a la acumulación de ROS, inducida por H₂O₂, AAPH y HOCl, por parte de CELLFOOD®. Los linfocitos se incubaron en PBS a 37°C, durante 10 minutos con 100 μM H₂O₂, 10 mM AAPH ó 125 μM HOCl en ausencia y presencia de CF (escala de dilución 1:2000-1:250). Los datos reflejan la media +/- SD de los tres experimentos.

Siendo particularmente susceptibles al daño oxidativo, los eritrocitos fueron elegidos también como sistema modelo, para la investigación de las propiedades antioxidantes de CF. Los RBC tienen una alta concentración celular de Hb y están expuestos directamente al oxígeno molecular. Al mismo tiempo, tienen una alta cantidad de ácido graso poliinsaturado en sus membranas y por eso son altamente susceptibles a la oxidación inducida por radicales peróxidos, que lleva a la pérdida de Hb y a una disminución de los niveles del GSH intracelular (Hseu et al., 2008; Magalhaes et al., 2009; Wang et al., 2009). En nuestros experimentos, hemos encontrado que CF protegió de forma efectiva a los RBC de la pérdida de Hb y de la disminución del GSH, inducida por H₂O₂ y AAPH proporcionando, así, una protección contra la hemólisis oxidativa y preservando el sistema endógeno de defensa antioxidante.

Además, se observó también una protección, por parte de CF en el caso de oxidación de los RBC por HOCl, que representa un buen sistema modelo para la investigación, del daño celular, inducido por neutrófilos (Winterbourn y Brennan, 1997; Vissers et al., 1998; Winterbourn, 2002). La exposición de los RBC al HOCl deriva en una pérdida de GSH intracelular, que precede a la oxidación de membranas tiol y a la formación de cloraminas (Vissers y Winterbourn, 1995). El bien conocido resultado final de la exposición de los RBC al HOCl, es la hemólisis celular (Vissers et al., 1994); de hecho, la acción del HOCl produce un cambio inmediato en la estructura de las membranas de los RBC, que afecta a la deformabilidad y permeabilidad de la membrana misma. En nuestros experimentos, hemos encontrado que CF reduce rápidamente la lisis celular y la disminución del GSH, inducidas por el HOCl.

La protección global de los RBC por parte de CF frente a su oxidación, puede explicar alguno de los efectos positivos de la suplementación de CF, en procedimientos de entrenamiento y en prestaciones deportivas de atletas profesionales (Milic y Djordjevic, 2009). El incremento del metabolismo celular y del recambio de Hb durante el ejercicio intenso, puede favorecer la producción de ROS en el interior de los RBC y la activación de leucocitos con la consiguiente liberación de productos de la activación de los neutrófilos (HOCl) (Santos-Silva et al., 2001). Considerando que la mayoría de las ROS tienen la capacidad de difundirse a través de la membrana de los RBC, y que los mismos RBC tienen limitados mecanismos de reparación, los RBC más

viejos pueden no tener la capacidad de resistir el estrés oxidativo, desarrollado en el interior de la célula; los RBC más jóvenes pueden desarrollar y/o acumular lesiones oxidativas. Un estado anémico puede tener lugar como resultado final de todo esto (Robinson et al., 2006). En este contexto, la suplementación de CF puede tener una gran relevancia para contrastar el efecto tóxico de las ROS, producido por el metabolismo celular (como los radicales peróxidos) o por la activación de neutrófilos (como el HOCl), protegiendo, de esta manera, a los RBC de la hemólisis y, por consiguiente a los atletas, de la anemia.

Finalmente, hemos usado los linfocitos como blancos celulares de la oxidación. Los linfocitos, al estar involucrados en la respuesta inmunitaria, están normalmente sujetos, *in vivo*, al estrés oxidativo (Knight, 2000). Además, estando los linfocitos inmediatamente sujetos a variaciones de antioxidantes en la sangre por la modificación de hábitos dietéticos, representan una línea celular fiable para estudiar los efectos de los antioxidantes dietéticos, en la protección de las células (Anderson et al., 1994; Foti et al., 2005). En nuestros experimentos hemos testado la protección de CF frente a la formación de radicales libres en linfocitos cargados con DCFH-DA derivada de la oxidación por H₂O₂, AAPH y HOCl. El compuesto fluorogénico DCFH-DA ha sido, extensivamente utilizado, como indicador del estrés oxidativo; de hecho emite fluorescencia cuando se oxida para convertirse en DCF, midiendo así la formación de especies reactivas en las células (Myhre et al., 2003). Incluso en este caso, hemos observado que CF redujo, de forma significativa, la formación de ROS intracelular, inducida por los tres agentes oxidantes, en función de la dosis.

5. Conclusiones

En el presente estudio hemos demostrado, claramente, que CELLFOOD® es un suplemento nutricional que proporciona una eficaz protección antioxidante, frente a agentes oxidantes relevantes a nivel pato-fisiológico. La protección *in vitro* de células y biomoléculas frente a los ataques de radicales libres, indica que CF puede ser un válido coadyuvante en la prevención y tratamiento de varias condiciones fisiológicas y patológicas, relacionadas con el estrés oxidativo, desde el envejecimiento a la anemia relacionada con el deporte; desde la fibromialgia a la degeneración neurológica y cáncer.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses.

Agradecimientos

Damos las gracias a la Dr. Francesca Carducci por su colaboración en el idioma inglés.

Referencias

Anderson, D., Yu, T.W., Phillips, B.J., Schemer, P., 1994. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res.* 307, 261-271.

Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T., 2005. Mitochondria oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.

Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarini, S., Francogli, S., Scoglio, S., Canestrari, F., 2004. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the bluegreen alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sci.* 75, 2353-2362.

Berger, M.M., 2005. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clin. Nutr.* 24, 172-183.

Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70-76.

Bohr, V.A., 2002. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA and some changes with

aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 804-812.

Cohen, R.A., Tong, X., 2010. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 55, 308-316.

Cordero, M.D., de Miguel, M., Carmona-López, I., Bonal, P., Campa, F., Moreno-Fernández, A.M., 2010. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in fibromyalgia. *Neuro Endocrinol. Lett.* 31, 169-173.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 52, 601-623.

Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., Gajewski, E., 1991. Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 285, 317-324.

Dyer, D.S., 2000. CELLFOOD®. Vital cellular nutrition for the new millennium, Feedback Books Inc.

Foti, P., Erba, D., Riso, P., Spadafranca, A., Criscuoli, F., Testolin, G., 2005. Comparison between daidzein and genistein antioxidant activity in primary and cancer lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 421-427.

Fusco, D., Colloca, G., Lo Monaco, M.R., Cesari, M., 2007. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin. Interv. Aging* 2, 377-387.

Galasko, D., Montine, T.J., 2010. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark. Med.* 4, 27-36.

Graziewicz, M.A., Day, B.J., Copeland, W.C., 2002. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res.* 30, 2817-2824.

Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Grignani, F., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G.P., Pelicci, P.G., 1998. High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res.* 58, 14-19.

Gungor, N., Knaapen, A.M., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G.R., Chiu, R.K., Godschalk, R.W., van Schooten, F.J., 2010. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis* 25, 149-154.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York.

Herrera, E., Jiménez, R., Aruoma, O.I., Herberg, S., Sánchez-García, I., Fraga, C., 2009. Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutr. Rev.* 67, S140-S144.

Hsueh, Y.C., Chang, W.H., Chen, C.S., Liao, J.W., Huang, C.J., Lu, F.J., Chia, Y.C., Hsu, H.K., Wu, J.J., Yang, H.L., 2008. Antioxidant activities of Toona Sinensis leaves extracts using different antioxidant models. *Food Chem. Toxicol.* 46, 105-114.

Kannan, K., Jain, S.K., 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Patho. Physiol.* 7, 153-163.

Knight, J.A., 2000. Review: free radical antioxidants, and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30, 145-158.

Lenaz, G., 1998. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 53-67.

Ljungman, M., Hanawalt, P.C., 1992. Efficient protection against oxidative DNA damage in chromatin. *Mol. Carcinog.* 5, 264-269.

Maehly, A.C., Chance, B., 1954. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.* 1, 357-424.

Magalhães, A.S., Silva, B.M., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Carvalho, M., 2009. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1372-1377.

Martarelli, D., Pompei, P., 2009. Oxidative stress and antioxidant changes during a 24-hours mountain bike endurance exercise in master athletes. *J. Sports Med. Phys. Fitness* 49, 122-127.

Milić, R., Djordjević, S., 2009. Cycling performance and Cellfood. In: Loland, S., BØ, K., Fasting, K., Hallén, J., Ommundsen, Y., Roberts, G., Tsolakidis, E. (Eds.), Book of Abstracts of the 14th Annual Congress of the European

- College Of Sport Science. Gamlebyen Grafiske A.S., Oslo, p. 230.
- Morris, J.C., 1966 The acid ionization constant of HClO from 5 to 35. *J. Phys. Chem.* 70, 3798-3805.
- Myhre, O., Andersen, J.M., Aarnes, H., Fonnum, F., 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate luminol and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem. Pharmacol.* 65, 1575-1582.
- Nieddu, M.E., Menza, L., Baldi, F., Frediani, B., Marcolongo, R., 2007. Efficacy of Cellfood's therapy (deutrosulfazyme) in fibromyalgia. *Reumatismo* 59, 316-321.
- Ohshima, H., Tatemichi, M., Sawa, T., 2003. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 417, 3-11.
- Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F., 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta* 333, 19-39.
- Piecznik, S.R., Neustadt, J., 2007. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp. Mol. Pathol.* 83, 84-92.
- Robinson, Y., Cristancho, E., Böning, D., 2006. Intravascular hemolysis and mean red blood cell age in athletes. *Med. Sci. Sports Exerc.* 38, 480-483.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York.
- Santos-Silva, A., Rebelo, M.I., Castro, E.M., Belo, L., Guerra, A., Rego, C., Quintanilha, A., 2001. Leukocyte activation erythrocyte damage lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin. Chim. Acta* 306, 119-126.
- Smith, H.S., Barkin, R.L., 2010. Fibromyalgia syndrome: a discussion of the syndrome and pharmacotherapy. *Am. J. Ther.* 17, 418-439.
- Solarska, K., Lewinska, A., Karowicz-Bilinska, A., Bartosz, G., 2010. The antioxidant properties of carnitine in vitro. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 15, 90-97.
- Song, Y., Driessens, N., Costa, M., De Deken, X., Detours, V., Corvilain, B., Maenhaut, C., Miot, F., Van Sande, J., Many, M.C., Dumont, J.E., 2007. Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 3764-3773.
- Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6, 389-402.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39, 44-84.
- Van Houter, B., Woschner, V., Santos, J.H., 2006. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 5, 145-152.
- Vissers, M.C., Stern, A., Kuypers, F., van den Berg, J., Winterbourn, C.C., 1994. Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.* 16, 703-712.
- Vissers, M.C., Winterbourn, C.C., 1995. Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. *Biochem. J.* 307, 57-62.
- Vissers, M.C., Carr, A.C., Chapman, A.L., 1998. Comparison of human red cell lysis by hypochlorous and hypobromous acids: insights into the mechanism of lysis. *Biochem. J.* 330, 131-138.
- Wallace, D.C., 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283, 1482-1488.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., 2009. Protection of wheat bran feruloyl oligosaccharides against free radical-induced oxidative damage in normal human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1591-1599.
- Winterbourn, C.C., Brennan, S.O., 1997. Characterization of the oxidation products of the reaction between reduced glutathione and hypochlorous acid. *Biochem. J.* 326, 87-92.
- Winterbourn, C.C., 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology* 181-182, 223-227.
- Yakes, F.M., Van, H.B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 514-519.
- Yap, Y.W., Whiteman, M., Cheung, N.S., 2007. Chlorinative stress: an underappreciated mediator of neurodegeneration? *Cell Signal.* 19, 219-228.
- Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A.G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., 2010. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem. Biol. Interact.* 188, 334-339.