

INVESTIGAR

Acceso abierto

StemForte Plus® para la activación de las células madre y la actividad de la telomerasa con fines de antienvjecimiento



Victor Chavez

Antecedentes

El envejecimiento celular es un fenómeno natural que es consecuencia de la disminución progresiva de la resistencia de las células al estrés y otros daños celulares, provocando una pérdida gradual de las funciones celulares. El estrés sobre las células, el efecto de desgaste celular, y las lesiones celulares; dan inicio al proceso que eventualmente resulta en la muerte de las células. Para reemplazar las células muertas con células nuevas, dentro de nuestro cuerpo tenemos las células madre; que se diferencian de las células comunes, porque pueden convertirse en cualquier célula requerida, según las necesidades del cuerpo [1].

Existen varios tipos de marcadores de CD, disponibles en diferentes tipos de células dentro del cuerpo (desde CD1 hasta CD247). Algunos de esos marcadores están presentes en las células madre. Estos son CD7, CD15, CD34, CD45, CD73, CD117, CD133, CD184, CD191, CD326, CD338 y similares. Cualquier sustancia química que pueda unirse con cualquiera de estos marcadores de CD, presentes en las células madre; podrá modular su función como activador, y puede dar lugar a una proliferación y diferenciación más rápidas de las células madre. Esto da como resultado un reemplazo más rápido de células nuevas en el lugar de las células dañadas o muertas. Esto significa que la activación de las células madre es posible; poniendo en marcha un fenómeno importante para la reparación y rejuvenecimiento más rápidos de las células del cuerpo [2, 3, 4].

Se han analizado varios productos químicos para determinar su función estimulante de las células madre, entre los que se incluye el plerixafor [5], tallo reginin-R (SRI) [5], G-CSF [6], https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/103353s5147lbl.pdf, GM-CSF, etc. (https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/103362s5237lbl.pdf). Pero todos ellos producen reacciones adversas de leves a moderadas.

Por lo tanto, existe la necesidad de un tratamiento más seguro y eficaz para los moduladores de células madre que asisten en la regeneración y el crecimiento de los tejidos. StemForte Plus® es una fórmula nutricional patentada que comprende una súper mezcla de varios antioxidantes naturales poderosos, como piel y semilla de uva, extracto de fruta, calostro bovino, algas pardas, árbol de kino, y muchos más ingredientes poderosos. El potencial antioxidante de StemForte Plus® se comprobó mediante el ensayo ORAC, y el valor ORAC observado fue 1867,15 $\mu\text{mol}/\text{TE}/\text{g}$ [7].

StemForte Plus® estimula la liberación natural de células madre adultas. Para probar científicamente esta afirmación, en el presente estudio se han utilizado células madre de médula ósea humana, cuantificando los marcadores CD34 y CD45 mediante el método de citometría de flujo [8, 9, 10, 11, 12].

Además, la telomerasa, una ribonucleoproteína, cataliza la adición de repeticiones TTAGGG a los extremos de los cromosomas de los vertebrados, utilizando una secuencia complementaria de su componente de ARN intrínseco como plantilla. La telomerasa restaura fragmentos cortos de ADN conocidos como telómeros, que de otro modo se acortan cuando una célula se divide mediante mitosis. La activación de la telomerasa conduce a un aumento de la vida útil de las células y retrasa el proceso de envejecimiento celular. Las sustancias químicas que pueden activar la enzima telomerasa pueden actuar como agentes antienvjecimiento.

En el presente estudio, se ha probado en actividad celular, el potencial de activación de la telomerasa de StemForte Plus®. El inmunoensayo enzimático fotométrico está diseñado para la detección de la actividad de la telomerasa, utilizando el Protocolo de amplificación repetida telomérica (TRAP). Telomerase PCR ELISA, que está diseñado para estudios de investigación de ciencias biológicas; para la detección cualitativa altamente sensible de la actividad de la telomerasa en extractos de cultivos celulares y otras muestras biológicas.

Correspondencia: vc20182021@gmail.com CEO - Nuvi Global, 1101s. Milken Ave Suite F, Ontario, CA 91761, EE. UU.



© El(los) autor(es). 2021 Acceso abierto Este artículo tiene una licencia Creative Commons Attribution 4.0 International License, que permite ser usado, compartido, adaptado, distribuido y reproducido en cualquier medio o formato, siempre y cuando usted dé crédito apropiado al autor(es) original(es) y la fuente, proporcione un enlace a la licencia Creative Commons, e indique si se hicieron cambios. Las imágenes u otro material de terceros en este artículo están incluidos en la licencia Creative Commons del artículo; a menos que se indique lo contrario en una línea de crédito bajo el material. Si el material no está incluido en Creative Commons del artículo licencia y su uso previsto no está permitido por la regulación legal o excede el uso permitido, deberá obtener permiso directamente del titular de los derechos de autor. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

El protocolo Telomerase PCR ELISA utiliza una mezcla de reacción de un solo tubo, que simplifica la amplificación. La técnica ELISA utiliza un cebador biotinilado para inmovilizar los productos de la reacción TRAP dentro de una microplaca recubierta de estreptavidina y una sonda marcada con DIG específica para la detección [13].

Los dos estudios anteriores se realizaron utilizando una concentración no citotóxica de StemForte Plus®. Para determinar esta concentración no citotóxica de StemForte Plus®, se realizó una prueba de citotoxicidad *in vitro* utilizando la línea celular Caco2, en un ensayo de actualización de rojo neutro, según OECD TG129 [14, 15].

Material y métodos

Detalles del sistema de prueba (células de médula ósea y línea celular): Para la prueba de citotoxicidad, se utilizó la línea celular Caco2 (ATCC®HTB-37™, células epiteliales del colon humano) adquirida en el National Centre for Cell Sciences. Para el resto, se utilizaron dos estudios *in vitro* con células de médula ósea humana (Cat No. 2S-101D, Lonza, EE. UU.).

Extracto del artículo de prueba y preparación de dilución:

Para el ensayo de citotoxicidad *in vitro*, se utilizó el medio de cultivo con suero como vehículo de extracción, ya que favorece el crecimiento celular y extrae sustancias polares y no polares. Se incubaron quinientos miligramos de polvo StemForte Plus® con 5 ml de medio completo (medio DMEM + 10% FBS + 1% de solución antibiótica) (concentración sin diluir de 100 mg/ml) en una incubadora con agitación a 37 °C durante la noche. El extracto se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos para sedimentar las partículas. El extracto se filtró a través de filtros de jeringa de 0,22 µM para su esterilización. Se prepararon las ocho concentraciones del elemento de prueba diluyendo el extracto primario usando diluciones 10 veces (por ejemplo, 1:10, 1:100 y 1:1000 hasta la séptima dilución). El medio de cultivo solo se utilizó como vehículo de control y se trató de la misma manera que el extracto del elemento de prueba [15, 16].

Citotoxicidad *in vitro*

Las células Caco-2 se separaron del matraz de cultivo mediante digestión enzimática (tripsina/EDTA) hasta una suspensión celular con una población de 10 x 10⁴ células/ml en medio completo. Se añadió un volumen de 100 µL de medio de cultivo en los pocillos periféricos de una placa de micro titulación de 96 pocillos, para considerarlo como un blanco. En los pocillos restantes, se agregaron 100 µL de una suspensión celular. Las células se incubaron durante 24 h ± 2 (5,0 ± 0,5 % de CO₂, 37 ± 1 °C ≥ 90% de humedad) para formar una monocapa semiconfluente, a fin de garantizar la recuperación y el crecimiento celular mediante microscopía para cada pocillo a lo largo de la placa de microtitulación. El lauril sulfato de sodio, los gránulos de polietileno de alta densidad (HDPE) y el control del vehículo se mantuvieron como control positivo, negativo y control en blanco, respectivamente, de manera similar a la extracción del elemento de prueba.

Después del tiempo de incubación para la preparación del extracto de prueba, se aspiró el medio de cultivo de cada pocillo de la placa. Por pocillo, se agregaron por duplicado 100 µL de medio de tratamiento que contenía la concentración adecuada del elemento de referencia o el extracto del elemento de prueba. La célula se incubó durante 48 ± 2 h. (5 ± 0,5% CO₂, 37 ± 1 °C, ≥ 90% de humedad). Esta prueba se realizó según la directriz TG129 de la OCDE [15, 16].

Para observaciones cualitativas, las células se observaron después de 48 horas. Durante el tratamiento, cada pocillo se examinó bajo un microscopio de contraste de fases para identificar errores sistemáticos de siembra de células, y características de crecimiento de las células de control y tratadas y se clasificó en grados de reactividad. Para el análisis cuantitativo, después de la incubación, se invirtió la placa para eliminar el medio de los pocillos. Las células adheridas se enjuagaron cuidadosamente con 250 µl/pocillo de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) precalentada.

La solución de enjuague se eliminó invirtiendo la placa y secándola con toallas de papel. Se agregaron 250 µL de colorante rojo neutro (NR) de 25 µg/mL en medio completo a todos los pocillos (incluidos los blancos) y se incubaron a (37 °C ± 1 °C, ≥ 90 % de humedad, 5,0 % ± 0,5 % de CO₂/ aire) durante 3,0 horas ± 0,1 h (37°C ± 1°C, ≥ 90% de humedad, 5,0% ± 0,5% CO₂/aire). Después de la incubación, se eliminó el medio NR y las células se enjuagaron cuidadosamente con 250 µl/pocillo de D-PBS precalentado. Se agregaron 100 µL de solución desorbente de NR (preparada con 49 partes de agua + 50 partes de etanol + 1 parte de ácido acético glacial) a todos los pocillos (incluidos los espacios en blanco) para extraer el tinte [15, 16, 17].

Las placas de microtitulación se agitaron rápidamente en un agitador de placas de microtitulación durante 20 a 45 minutos. Las placas se protegieron de la luz mientras se agitaban. Las placas se mantuvieron en posición de reposo durante al menos cinco minutos después de retirarlas del agitador/mezclador de placas. No se observó ninguna burbuja en la placa. La absorción de luz se midió a 540 nm en un lector de placas de microtitulación utilizando los blancos como referencia [18].

Una disminución en el número de células vivas da como resultado una disminución en la actividad metabólica de la muestra. Esta disminución se correlaciona directamente con la cantidad de rojo neutro detectada según lo monitoreado por la densidad óptica a 540 nm. Se calculó la concentración inhibidora media máxima (CI50), que corresponde a la CI50 para medir la potencia de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica.

Estimulación de células madre (primarias) *in vitro*

Se cultivaron células madre (primarias) de médula ósea humana en un ambiente controlado seguido de estimulación con concentraciones no citotóxicas del elemento de prueba junto con la concentración única de los controles que se probaron durante varios puntos de tiempo. La suspensión de células madre de médula ósea se ajustó para alcanzar una población de 5 × 10⁴ células/ml en un medio completo.

Se añadieron 500 μ L de una suspensión celular a placas de cultivo de tejidos de 12 pocillos. Las células se incubaron durante 24 horas ($5,0 \pm 0,5$ % de CO_2 , 37 ± 1 °C, ≥ 90 % de humedad) para formar una monocapa semiconfluyente y una suspensión. Este período de 24 horas asegura la recuperación, adherencia y progresión celular a la fase de crecimiento exponencial. Cada pocillo se examinó bajo un microscopio de contraste de fases para garantizar que el crecimiento celular fuera relativamente uniforme en toda la placa de cultivo. Se utilizó medio de cultivo con suero como vehículo de extracción y gránulos de HDPE como control negativo.

El extracto de Stem Forte Plus® preparado en medio de cultivo con suero se usó para tratar las células a fin de analizar su efecto con respecto al nivel de dosis durante el tiempo especificado. Se usaron cinco concentraciones no citotóxicas (1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml y 0,0001 mg/ml) de extracto StemForte Plus® para estimular las células durante cuatro puntos de tiempo diferentes en intervalos de 8, 24, 48 y 72 horas para obtener resultados razonables en condiciones de cultivo específicas ($5 \pm 0,5$ % de CO_2 , 37 ± 1 °C, ≥ 90 % de humedad). El medio de cultivo solo se utilizó como vehículo de control. Después de completar la incubación durante puntos de tiempo variables, la suspensión celular se recogió en un tubo de centrifuga estéril para centrifugarse a 1000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El medio de cultivo se aspiró de cada tubo y se lavó con PBS enfriado seguido de centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.

La citometría de flujo fue diseñada para detectar cambios en la expresión del receptor de superficie en células estimuladas. Después de la estimulación in vitro, el sedimento celular se resuspendió en tampón FACS enfriado (PBS con 5 % de FBS, estéril) y se mantuvo a 2-8 °C, si no se procesaba durante un máximo de 60 minutos. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C. Para bloquear interacciones no específicas, las células se preincubaron con 100 μ l de suero fetal bovino durante 10 a 20 minutos a 25 °C antes de teñirlas. Las células se lavaron con manipulación suave añadiendo cuatro volúmenes de tampón FACS seguido de centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sedimento celular se suspendió en 100 μ l de tampón de fijación (6 % de PFA-paraformaldehído en PBS) y se incubó a 2-8 °C por 30 min.

Las células se lavaron con tampón FACS tres veces el volumen por centrifugación durante 5 minutos a 4 °C. A la cantidad anticuerpos conjugado con fluorocromo directo para CD34 y CD45 se añadió en tampón de tinción en un volumen diluido hasta 1:2500. El volumen de tinción final de 100 μ L se añadió al sedimento de las células [19]. Se combinaron varios anticuerpos según el requisito de analizarlos en el mismo conjunto para compararlos. La célula se resuspendió para asegurar una única población celular mediante golpecitos suaves y se incubó durante al menos 60 minutos a 2-8 °C. Se protegió de la luz. Las células se lavaron con tampón FACS tres veces el volumen por centrifugación durante 5 minutos a 2-8°C. Para el almacenamiento de las muestras antes del análisis, las células se suspendieron en 100 μ l de tampón de tinción por citometría de flujo. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo siguiendo el método recomendado por el fabricante y según el principio de compuerta (gating).

Las células se separaron en función de sus fluorocromos asociados con receptores celulares. Se analizaron al menos 1000 células y se realizó una comparación de su cantidad de expresión del receptor. El aumento o disminución porcentual se calculó en función de la expresión del receptor, utilizando el software BD Diva. Las células no tratadas se consideraron como una población importante que se seleccionaría como control para el análisis. La expresión del marcador CD dentro de la célula no tratada se consideró como la unidad base y, en comparación, con el control, tenemos que encontrar nuestro número de aumento o disminución en el nivel de expresión de CD34 y CD45 en el caso de células incubadas con StemForte Plus® en diferentes concentraciones (1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml y 0,0001 mg/ml) así como después de la incubación en diferentes momentos, a saber. 8, 24, 48 y 72 h.

Protocolo de activación de la telomerasa in vitro

Para realizar la actividad de estimulación de la telomerasa in vitro de Stem-forte Plus®, se utilizó el método TRAP. Las células madre (primarias) de médula ósea estimuladas, se recolectaron en PBS enfriado seguido de centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sedimento se conservó a -80 °C para analizarlo más a fondo.

Las células sedimentadas congeladas se descongelaron y se resuspendieron en 200 μ l de reactivo de lisis preenfriado en hielo retropipetando al menos 3 veces y se incubaron en hielo durante 30 minutos. El lisado se centrifugó durante 20 min a 2-8 °C. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Para garantizar que no se transfirieran restos celulares de las células sedimentadas, solo se recogieron 175 μ l del extracto celular. Para cada muestra del grupo de prueba y control, se transfirieron 25 μ L de mezclas de reacción a un tubo adecuado para la amplificación por PCR, seguido de la adición de 3 μ L de extracto celular por tubo y 50 μ L de agua estéril. Los tubos se transfirieron a un ciclador térmico y se realizó una reacción combinada de elongación/amplificación del cebador, es decir; 1 ciclo a 25°C por 10 min, 1 ciclo a 94°C por 5 min, 30 ciclos para los 30s (94°C), 30s (50°C), 90s (72°C), 1 ciclo a 25°C C durante 10 min y mantener a 4 °C. Los 5 μ l del producto amplificado se utilizaron a partir de una mezcla en tubo con 20 μ l de reactivo de desnaturalización. Después de la incubación a 25 °C durante 10 minutos, se agregaron 225 μ l de tampón de hibridación por tubo y se mezclaron completamente mediante agitación. Se transfirieron 100 μ l de la mezcla por pocillo de la microplaca prevestida y se incubaron a 37°C en un agitador durante 2 horas. Los pocillos se cubrieron con lámina autoadhesiva y se incubaron durante 1 hora más a 37°C. La solución de hibridación se eliminó, seguido de lavado con 250 μ l de tampón de lavado por pocillo durante un mínimo de 30 segundos cada uno y el tampón de lavado se eliminó. Se agregaron 100 μ l de solución de trabajo Anti-DIG-POD en cada pocillo. La microplaca se incubó a 18 - 22°C durante 30 minutos mientras se agitaba. La solución se eliminó por completo. Se enjuagó 5 veces con 250 l de tampón de lavado por pocillo durante un mínimo de 30 segundos cada uno y se retiró el tampón de lavado. Se agregaron 100 μ l de soluciones de sustrato de TMB por pocillo hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Los pocillos se cubrieron con papel de aluminio y se incubaron para desarrollar el color entre 15 y 25 °C durante 10 a 20 minutos mientras se agitaban. Sin retirar el sustrato reaccionado, se agregaron 100 µL de reactivo de parada por pocillo para detener el desarrollo del color. Utilizando un lector de microplacas (ELISA), se midió la absorbancia de cada una de las muestras a 450 nm dentro de los 30 minutos posteriores a la adición del reactivo de parada.

Se calculó el promedio de cada lectura duplicada. La lectura del blanco se restó de cada valor experimental promedio de todos los controles y pruebas para ser considerado como valor corregido. La lectura de la célula no tratada se consideró como la unidad base, y en comparación con el control, tenemos que encontrar nuestro número de aumento o disminución de la expresión de actividad de la telomerasa en las células incubadas con StemForte Plus®.

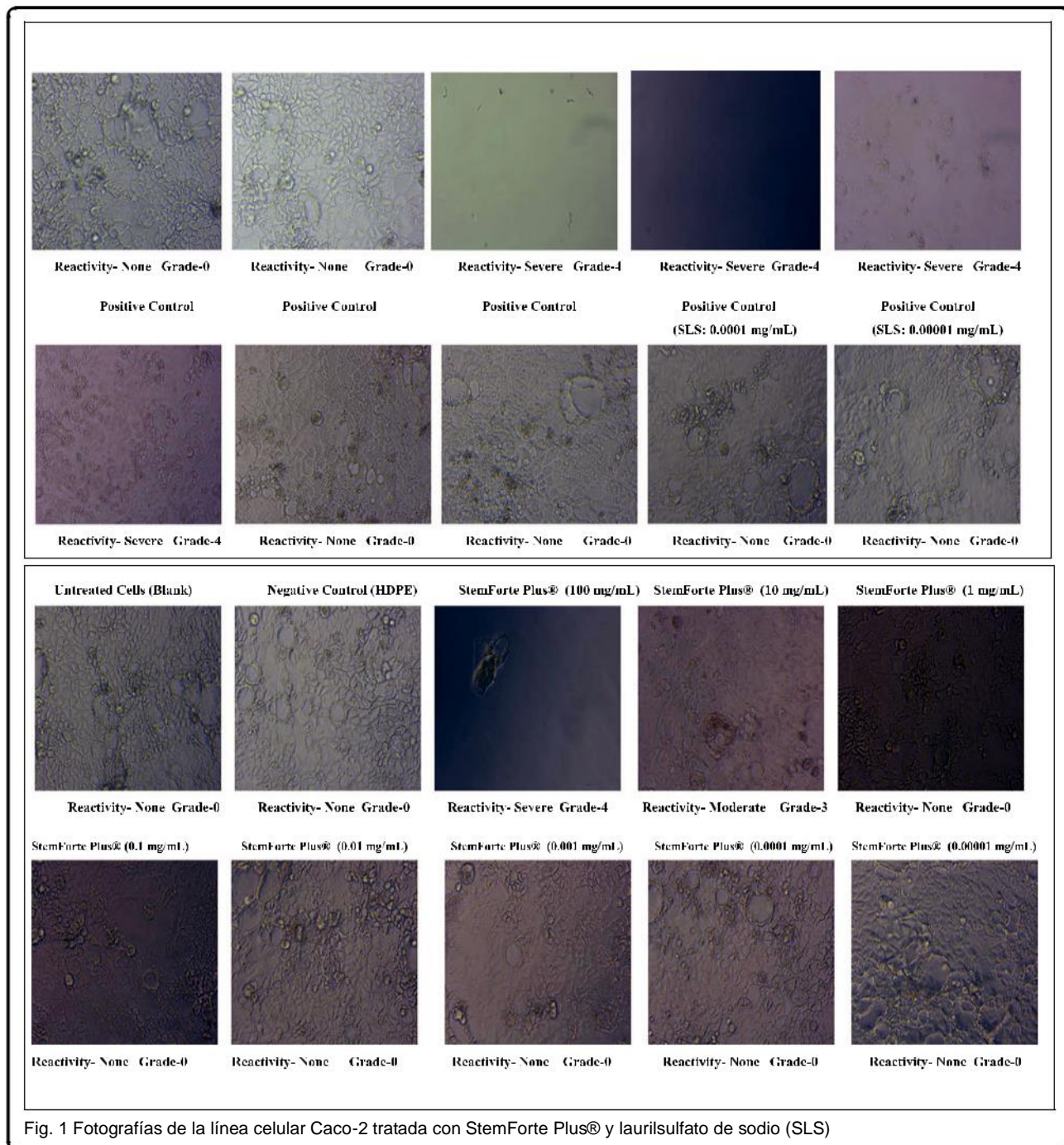
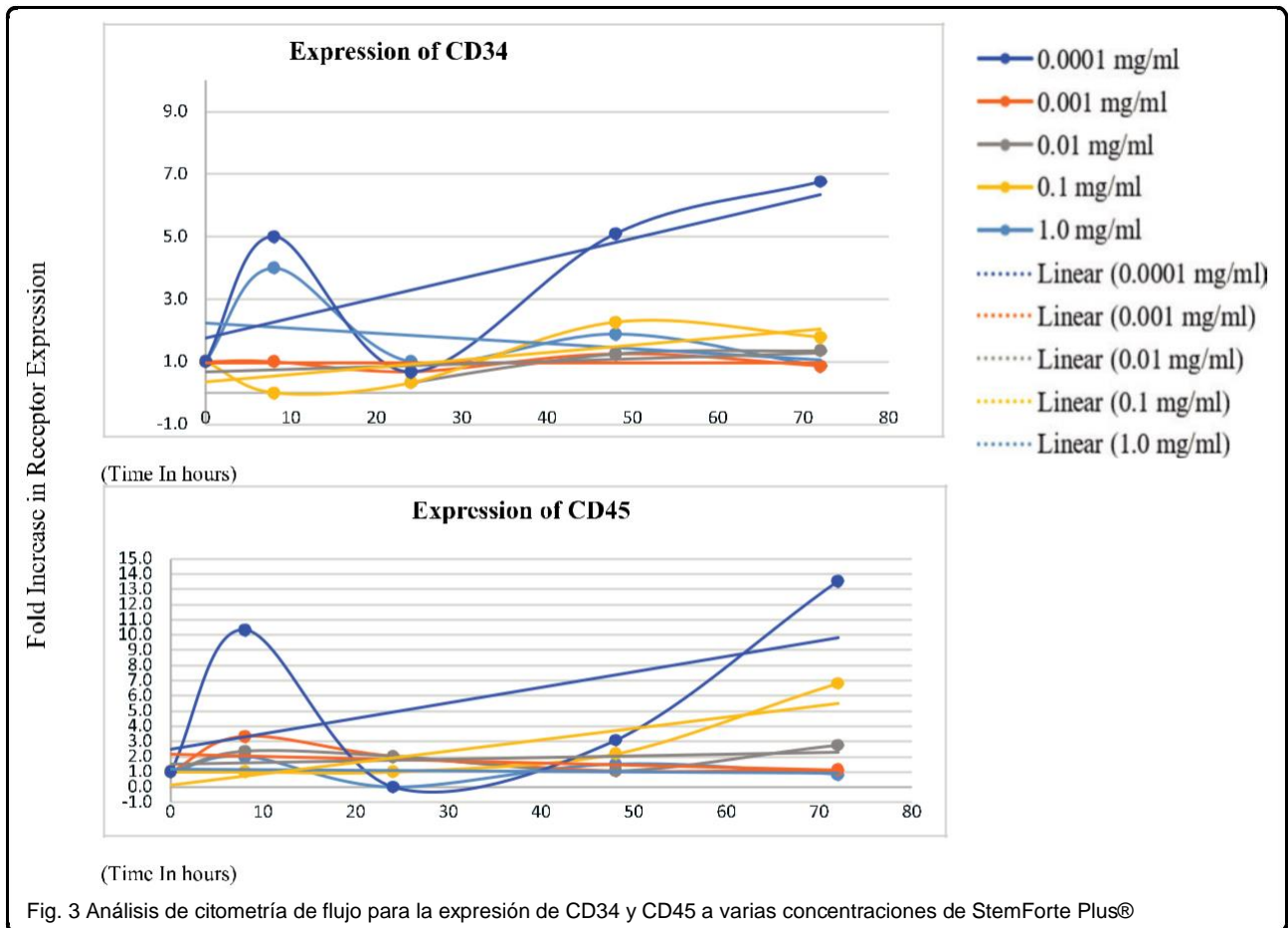
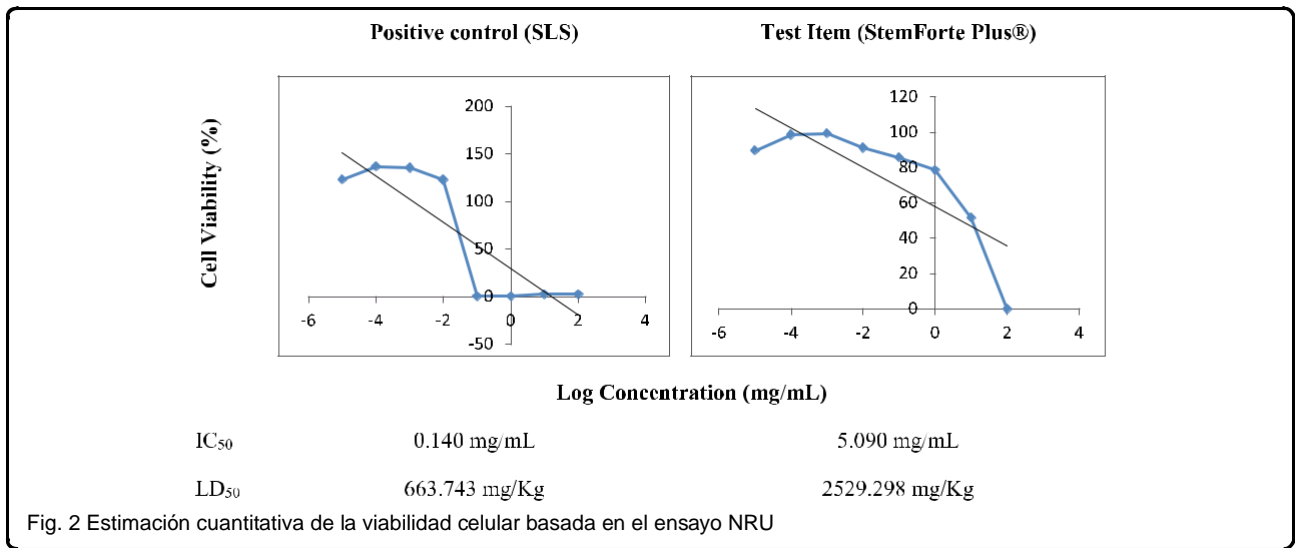


Fig. 1 Fotografías de la línea celular Caco-2 tratada con StemForte Plus® y laurilsulfato de sodio (SLS)



La lectura de las células no tratadas se consideró como la unidad base y, en comparación con el control, debemos determinar el aumento o la disminución del nivel de actividad de la telomerasa en las células incubadas con StemForte Plus® en diferentes concentraciones (1 mg/ml, 0,1 mg /ml, 0,01 mg/ml, 0,001 mg/ml y 0,0001 mg/ml), así como después de la incubación en diferentes puntos temporales, a saber. 8 h, 24 h y 48 h [13, 14, 15].

Resultados

Citotoxicidad in vitro

Se realizó un examen microscópico para detectar cambios en la morfología general de las células, vacuolización, desprendimiento, lisis celular e integridad de la membrana. La asignación de grados de reactividad y la determinación del porcentaje de viabilidad celular se realizó en función de las características de los grupos de control. El extracto de StemForte Plus® no ha mostrado reactividad y presenta una viabilidad celular aceptable (>70% de viabilidad) en concentraciones de 1 mg/ml e inferiores. Por lo tanto, se tomó 1 mg/ml como la dosis no citotóxica más alta en los dos experimentos in vitro siguientes utilizando células de médula ósea humana.

Con base en la concentración-respuesta del nivel de citotoxicidad, se calculó la CI50, que es una medida de la eficacia de una sustancia para inhibir el crecimiento celular. La CI50 se estimó en 5.090 mg/mL cuando se trató con exposición directa a la línea celular Caco-2 bajo la condición experimental de ensayo in vitro.

Las limitaciones de los métodos NRU in vitro se deben en gran medida a las diferencias entre los sistemas de cultivo celular y animal completo.

Por lo tanto, los datos generados mediante la experimentación in vitro se pueden utilizar para la determinación de dosis iniciales en pruebas de toxicidad sistémica oral aguda. La LD50 se estimó en 2529,298 mg/kg (para ratas) para StemForte Plus® según la fórmula mencionada en OECD TG129 para el artículo de prueba con peso molecular desconocido [15, 16].

Las fotografías de la morfología celular de las células tratadas se proporcionan en la Fig. 1. El gráfico del porcentaje de viabilidad celular se muestra en la Fig. 2.

Efecto de StemForte plus® sobre la expresión del marcador CD

Se observó que hubo aumentos dependientes de la concentración en la expresión de CD34 y CD45 después de la administración de una dosis única de StemForte Plus®. El mayor aumento se observó a la concentración de 1 mg/ml. Además, también se observó que después de 72 horas de incubación hubo un aumento de 7 veces en el caso del marcador CD34 mientras que hubo un aumento de 14 veces en el marcador CD45 en las células tratadas con StemForte Plus® (Ver Figs. 3, 4 y 5).

Efecto de StemForte plus® sobre la actividad de la telomerasa

De las cinco concentraciones diferentes de extracto StemForte Plus®, una concentración media (0,01 mg/ml) provoca un aumento de la actividad de la telomerasa en 7,2 veces después de 8 horas de incubación. Posteriormente hubo una disminución en la actividad de la telomerasa a medida que aumenta el tiempo de incubación (ver Fig. 6).

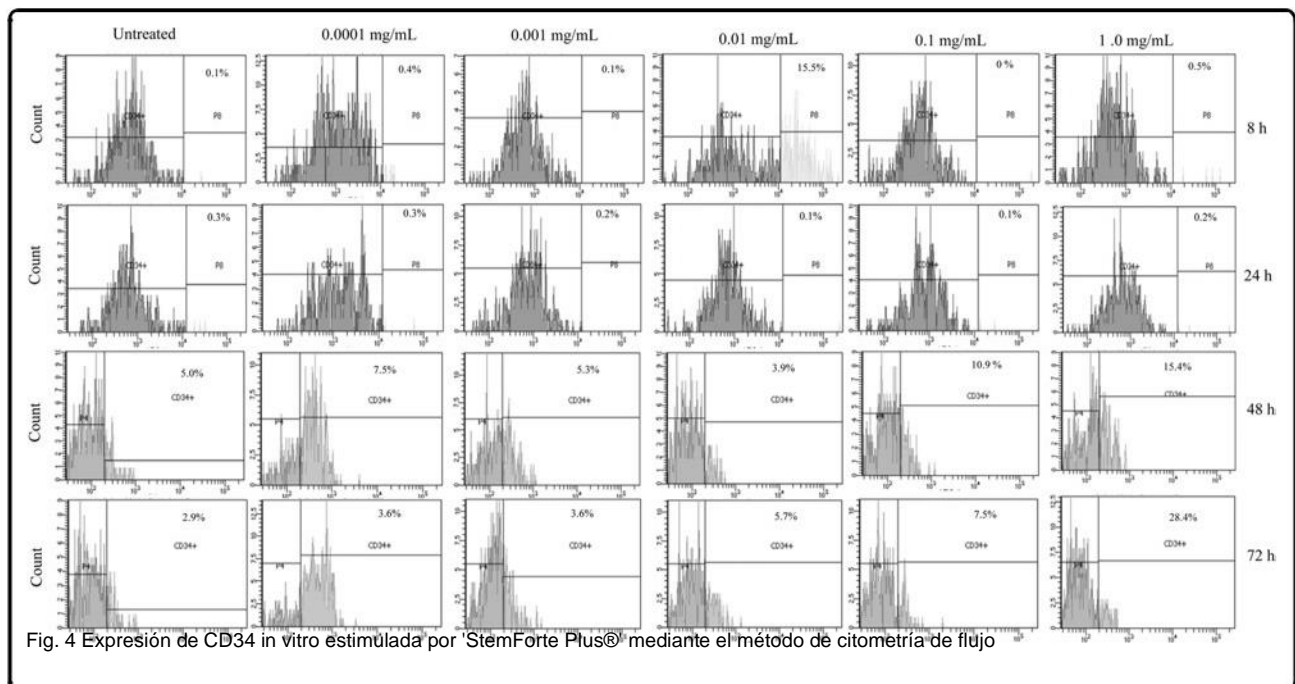
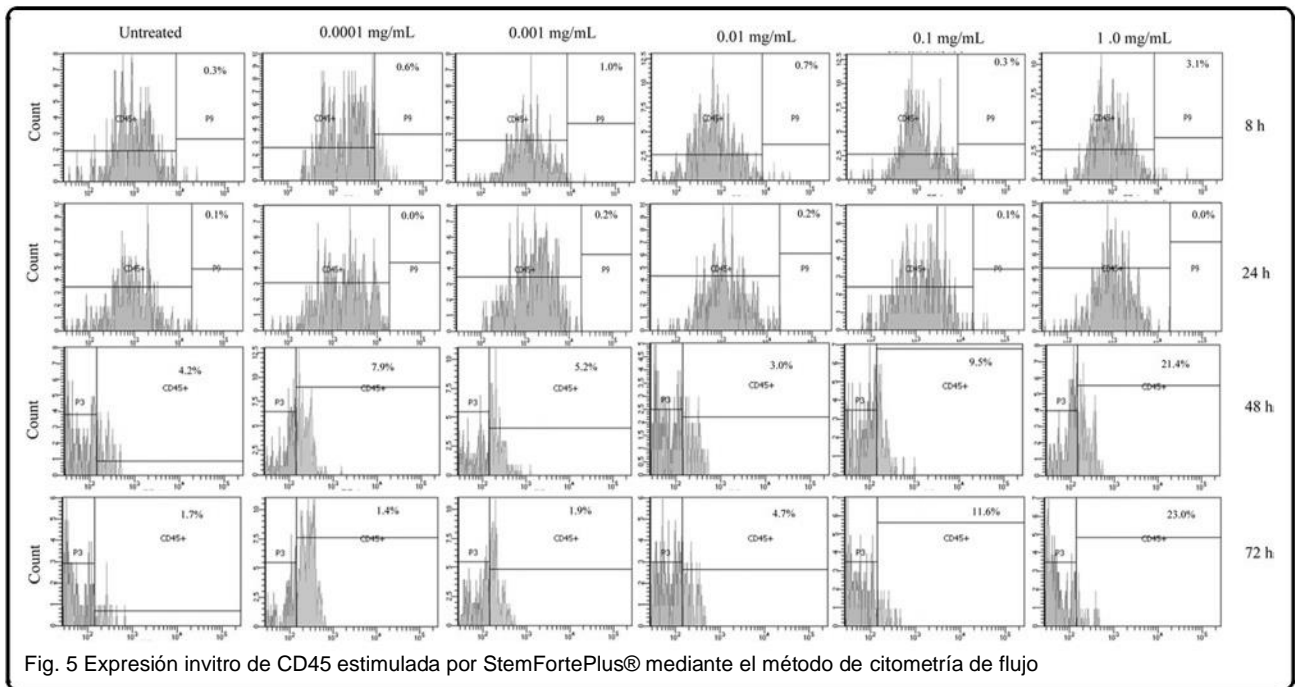


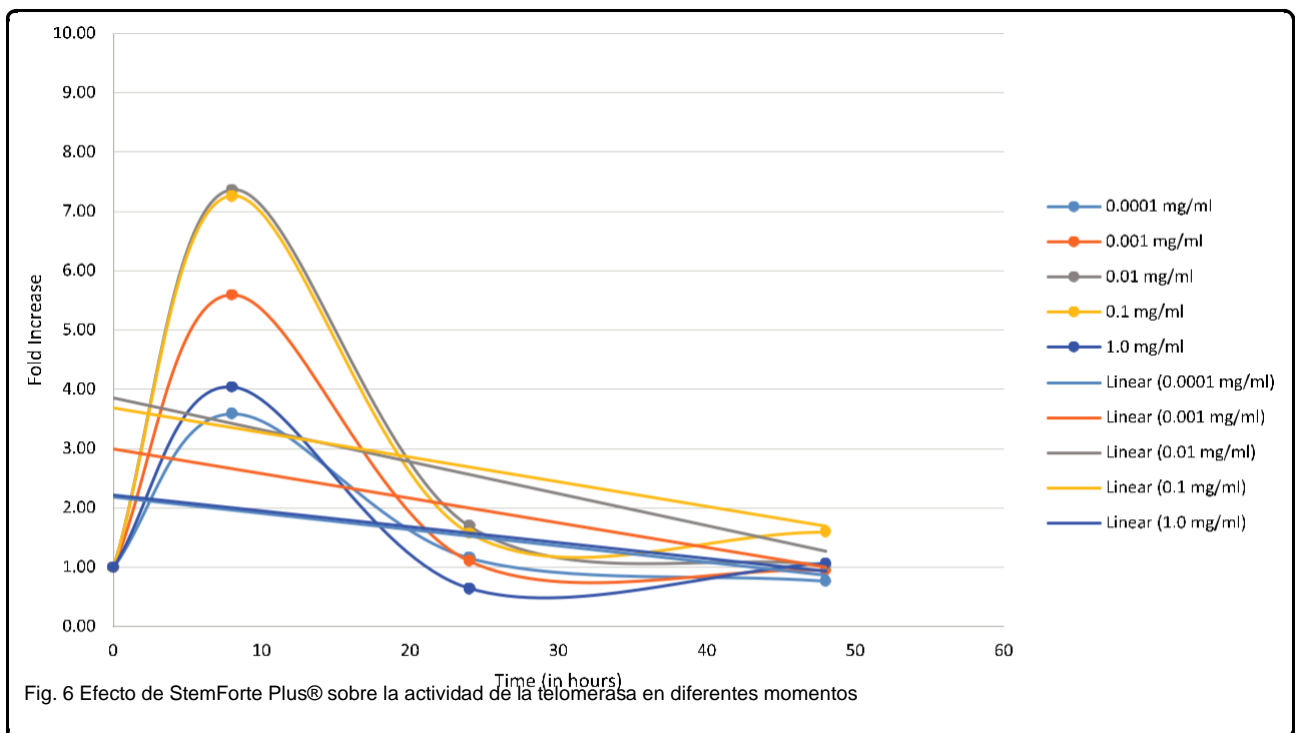
Fig. 4 Expresión de CD34 in vitro estimulada por StemForte Plus® mediante el método de citometría de flujo



Discusión

Las pruebas de citotoxicidad in vitro de Stemferte Plus® se realizaron utilizando la línea celular Caco2 y según el método descrito en OECD TG129 utilizando el método de absorción de rojo neutro (NRU).

De las ocho concentraciones diferentes de Stemferte Plus® que fueron analizadas, se encontró que no era citotóxica en concentraciones de 1 mg/mL o inferiores. La IC50 y la LD50 calculadas con los criterios proporcionados en el documento de orientación TG129 de la OCDE fueron 5,090 mg/ml y 2529,298 mg/kg para ratas, respectivamente.



Utilizando los datos de la Dosis Terapéutica en rata ($LD50/10 = 2529.298/10 = 252.93 \text{ mg/kg}$), se calculó la dosis terapéutica humana ($\text{mg/kg} / 6.2 = 252.93/6.2 = 40.80 \text{ mg/kg}$) en humanos. Considerando el peso corporal promedio de humanos (60 kg), la dosis humana diaria de Stemforte Plus® (HDD) = $40.80 \times 60 = 2448 \text{ mg} = 2.448 \text{ g}$ (Aprox. 5 cápsulas de 500 mg cada una) por día. Se calculó la dosis tóxica en humanos (HTD), será $HDD \times 10 = 2.448 \times 10 = 24,48 \text{ GM}$ por día (aproximadamente 49 cápsulas de 500 mg por día).

Al ser estimuladas con Stemforte Plus®, las células madre (primarias) hematopoyéticas, mesenquimales y estromales que se originan en la médula ósea y son moduladoras del sistema inmunológico; mostraron una regulación positiva de la expresión de CD34 y CD45.

Stemforte Plus® ha mostrado un aumento de 7 veces en la expresión de CD34, que se descifró como pluripotencia, que actúa como origen del linaje de células hematopoyéticas que contribuye al linaje mieloide, incluido el linaje eritroide y el linaje linfóide inmunológico específico, seguido de una reducción tras la maduración.

De manera similar, Stemforte Plus® ha mostrado un aumento de 14 veces en la expresión de CD45, que actúa como origen del linaje de células eritroide y el linaje linfóide inmunológico específico. La regulación positiva de los marcadores CD34 y CD45 pueden diferenciar las células madre hematopoyéticas y las células madre somáticas y, por lo tanto, acelerar la regeneración y el crecimiento de los tejidos [20, 21, 22]. Stemforte Plus® puede ser una fórmula nutricional natural eficaz para estimular las células madre y así acelerar el proceso de regeneración y crecimiento celular y tisular. Sin embargo, los estudios funcionales se planificarán y ejecutarán para el mismo por separado.

Stemforte Plus® también produce un aumento de 7 veces en la actividad de la telomerasa. La estimulación de la enzima telomerasa, relacionada con un aumento en la producción de telómeros, lo que resulta en una extensión de la vida útil de cualquier célula somática [23, 24]. Esto indica que es probable que Stemforte Plus® actúe como una potente fórmula nutricional natural antienvjecimiento. Sin embargo, los estudios funcionales se planificarán y ejecutarán para el mismo por separado.

Conclusiones

La evaluación cualitativa y cuantitativa del estudio de citotoxicidad in vitro de Stemforte Plus® resultó no citotóxica después de 48 horas de tratamiento con una concentración de 1 mg/mL o menos. Stemforte Plus® también aumenta la expresión de los marcadores CD34 y CD45 y, por lo tanto, es probable que aumente la diferenciación y proliferación de células madre hematopoyéticas, así como de células madre somáticas y, por lo tanto, acelere la regeneración y el crecimiento de los tejidos. Además, Stemforte Plus® también aumenta la actividad de la telomerasa y, por lo tanto, es probable que actúe como una potente formulación nutricional natural antienvjecimiento. En resumen, Stemforte Plus® puede ser útil para la regeneración de tejidos, así como como fórmula nutricional natural antienvjecimiento. Sin embargo, se realizarán más estudios funcionales para determinar los efectos farmacodinámicos de Stemforte Plus®.

Abreviaturas

≥: Mayor que igual a; °C: Grado centígrado; µg: Microgramo; l: Micro litro; 2S-101D: número de catálogo de Lonza para ampolla crioconservada de Células mononucleares de médula ósea humana que contienen ≥5 millones de células; Anti-DIG-POD: Anti-digoxigenina-Peroxidasa; ATCC: cultura tipo americana recopilación; Caco2: La línea celular inmortalizada de cáncer colorrectal humano células de adenocarcinoma; CD: Cluster de diferenciación; CXCR4: quimiocina receptor tipo 4; DMEM: medio esencial mínimo de Eagle; ADN: Ácido desoxirribonucleico; DPBS: solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco; ELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; FACS: Célula activada por fluorescencia clasificación; FBS: Suero bovino fetal; FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos; G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF: granulocitos macrófagos factor estimulante de colonias; LCR rico en G: rico en guanina Ácido desoxirribonucleico; horas: Horas; HDD: dosis diaria humana; HDPE: Alta densidad polietileno; HSC: Célula madre hematopoyética humana; HTD: Humano Dosis Terapéutica; IC50: concentración inhibitoria máxima media; DL50: mediana dosis letal; mg: Miligramo; ml: Mililitro; nm: Nano metro; NRU: rojo neutro Consumo; OECD TG129: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos Directrices de ensayo 129; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PFA: paraformaldehído; RPM: Rotación por minuto; s: Segundo; SIG: Superficie inmunoglobulina; SR1: StemRegenin1; TTAAGGG: secuencia de ADN - patrón de repetición en tándem; USA: Estados Unidos de América; TMB: 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina; TRAP: Protocolo de amplificación repetida telomérica;

Expresiones de gratitud

Me gustaría agradecer a Accuprec Research Labs Pvt. Ltd., Ahmedabad, Gujarat, India por proporcionar sus valiosos aportes y asistencia profesional para la ejecución del presente estudio.

Contribuciones del autor

El Sr. Víctor Chávez ha diseñado los experimentos, interpretado los datos y conceptualizó este manuscrito. El(los) autor(es) leyeron y aprobaron la versión final del manuscrito.

Fondos

Este trabajo fue apoyado por Nuvi Global, Ontario California.

Disponibilidad de datos y materiales.

No aplica.

Declaraciones

Aprobación ética y consentimiento para participar No aplica.

Consentimiento para publicación

Sí.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses contrapuestos.

Recibido: 15 febrero 2021 Aceptado: 11 junio 2021

Publicado en línea: 05 junio 2021

Referencias

1. Facchin F, Bianconi E, Canaider S, Basoli V, Biava PM, Ventura C. Tejido regeneración sin trasplante de células madre: potencial de autocuración de química ancestral y energías físicas. *Células Madre Int.* 2018;2018:3–4. <https://doi.org/10.1155/2018/7412035>.
2. Julius MC, Robert EL, Huan W. Grupo de antígenos de diferenciación (CD). *Guía de inmunología*; 2004. pág. 47–124.
3. Sharma S, Cabana R, Shariatmadar S, Krishan A. Volumen celular y marcador expresión en células madre de aféresis de sangre periférica humana. *Cytom Parte AJ Int Soc Anal Cytol.* 2008;73(2):160–7. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20524>.
4. Arndt K, Grinenko T, Mende N, Reichert D, Portz M, Ripich T, et al. CD133 es un modificador de las frecuencias de progenitores hematopoyéticos pero es prescindible para el mantenimiento de células madre hematopoyéticas de ratón. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(14):5582–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215438110>.
5. Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hübel K, Cooper S, et al. Movilización de células progenitoras hematopoyéticas en voluntarios sanos por AMD3100, un antagonista de CXCR4. *Sangre.* 2003;102(8):2728–30. <https://doi.org/10.1182/sangre-2003-02-0663>.
6. Calandra G, McCarty J, McGuirk J, Tricot G, Crocker SA, Badel K, et al. AMD3100 más G-CSF puede movilizar con éxito células CD34+ de no Pacientes con linfoma de Hodgkin, enfermedad de Hodgkin y mieloma múltiple movilización previamente fallida con quimioterapia y/o citoquinas tratamiento: datos de uso compasivo. *Transplante de médula ósea.* 2008;41(4): 331–8 <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705908>

7. Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, et al. Aryl antagonistas de los receptores de hidrocarburos promueven la expansión de humanos células madre hematopoyéticas. *Ciencias*. 2010;329(5997):1345–8. <https://doi.org/10.1126/ciencia.1191536>.
8. Holdsworth MT, Mathew P. Eficacia de los factores estimulantes de colonias en leucemia. *Ann Pharmacother*. 2001;35(1):92–108. <https://doi.org/10.1345/atel.19117>.
9. Boulais PE, Mizoguchi T, Zimmerman S, Nakahara F, Vivie J, Mar JC, et al. La mayoría de la fracción de células CD45-Ter119-CD31-médula ósea es de origen hematopoyético y contiene progenitores eritroides y linfoides. *inmunidad*. 2018;49(4):627–39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.019>.
10. Carvalho JM, Souza MKD, Buccheri V, Rubens CV, Kerbauy J, Oliveira JSRD. Células positivas para CD34 y sus subpoblaciones caracterizadas por flujo análisis de citometría en la médula ósea de donantes alogénicos sanos. *São Paulo Med J*. 2009;127(1):12–8. <https://doi.org/10.1590/S1516-31802009000100004>.
11. Repetto G, Del Peso A, Zurita JL. Ensayo de captación de rojo neutro para la estimación de viabilidad celular/citotoxicidad. *Protocolo Nat*. 2008;3(7):1125. 12. Radtke S, Haworth KG, Kiem HP. La frecuencia de CD133+ multipotente CD45RA: las células madre hematopoyéticas CD34+ no aumentan en el hígado fetal en comparación con las fuentes de células madre adultas. *Exp Hematol*. 2016;44(6):502–7. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.02.011>
12. Radtke G, Del Peso A, Zurita JL. Ensayo de captación de rojo neutro para la estimación de viabilidad celular/citotoxicidad. *Protocolo Nat*. 2008;3(7):1125. 12. Radtke S, Haworth KG, Kiem HP. La frecuencia de CD133+ multipotente CD45RA: las células madre hematopoyéticas CD34+ no aumentan en el hígado fetal en comparación con las fuentes de células madre adultas. *Exp Hematol*. 2016;44(6):502–7. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.02.011>
13. Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S. Evaluación de citotoxicidad de una hierba tailandesa utilizando ensayos de tetrazolio (MTT) y sulforhodamina B (SRB). *J Anal Ciencia Tecnología* 2018;9(1):1–6.
14. Wei L, Guo Y, Yan Z. Detección de actividad de telomerasa humana por telomerasa Ensayo TRAP-ELISA. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 1998;20(4):264–6.
15. OCDE ED. Documento de orientación sobre el uso de pruebas de citotoxicidad para estimar dosis iniciales para las pruebas de toxicidad sistémica oral aguda. Evaluación de pruebas de la serie OCDE. 2010;20:1–54.
16. Anónimo, Serie de la OCDE sobre principios de buenas prácticas de laboratorio y Seguimiento del Cumplimiento, 1998, Número 1. Principios de la OCDE sobre Buenas Práctica de laboratorio (revisada en 1997) No. ENV/MC/CHEM (98) 17.
17. Regulaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) de la Administración de Alimentos y Medicamentos como se establece en el Título 21 del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos, Parte 58, 2018.
18. Requisitos generales para la competencia de ensayo y calibración laboratorios: ISO 17025:2017.
19. Winckler J. Vital tinción de lisosomas y otros orgánulos celulares de la rata con rojo neutro (traducción del autor). *Prog. Histochem Cytochem*. 1974;6(3):1–91.
20. Salati S, Zini R, Bianchi E, Testa A, Mavilio F, Manfredini R, et al. Papel de CD34 antígeno en la diferenciación mieloide de células progenitoras hematopoyéticas humanas. *Células madre*. 2008;26(4):950–9. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0597>.
21. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Células madre hematopoyéticas: el paradigma Célula madre específica de tejido. *Soy J Pathol*. 2006;169(2):338–46. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060312>.
22. Higashiyama R, Nakao S, Shibusawa Y, Ishikawa O, Moro T, Mikami K, et al. Contribución diferencial de las células derivadas de la médula ósea y residentes dérmicas a la producción de colágeno durante la cicatrización de heridas y la fibrogénesis en ratones. *J Invest Dermatol*. 2011;131(2):529–36. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.314>.
23. Chiu CP, Dragowska W, Kim NW, Vaziri H, Yui J, Thomas TE, et al. Diferencial expresión de la actividad de la telomerasa en progenitores hematopoyéticos de adultos médula ósea humana. *Células madre*. 1996;14(2):239–48. <https://doi.org/10.1002/vastago.140239>.
24. Zimmermann S, Glaser S, Ketteler R, Waller CF, Klingmüller U, Martens UM. Efectos de la modulación de la telomerasa en células progenitoras hematopoyéticas humanas. *Células madre*. 2004;22(5):741–9. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-741>.

Nota del editor

Springer Nature se mantiene neutral con respecto a las reclamaciones jurisdiccionales en mapas publicados y afiliaciones institucionales.

• fast,
•
•
•
•
•

pes

Learn more b

