



Evidencias científicas de los efectos biomédicos derivados de la exposición al sistema Biow



Enrique Caso Peláez MSc., PhD., MD



Índice de contenidos

1. Presentación
2. Identificación de los efectos inducidos por la exposición al sistema Biow
 - 2.1. Nanopartículas
 - 2.2. Biodisponibilidad y Activación Celular
 - 2.3. Estrés Oxidativo
 - 2.4. Proteostásis
 - 2.5. Energía Mitocondrial
 - 2.6. Mejoramiento celular
 - 2.7. Inflamación
 - 2.8. Oxigenación y vascularización
 - 2.9. Función Linfocitaria
 - 2.10. Función Eritrocítica
 - 2.11. Inmunosenescencia
3. Evidencia científica individualizada de los efectos derivados de la exposición al sistema Biow
4. Documentos justificativos de evidencia científica de los efectos derivados de la exposición al sistema Biow



1.- Presentación

Como director biomédico de Biow es mi intención trasladar algunas consideraciones relativas al efecto del sistema Biow sobre diferentes procesos fisiológicos que considero de interés para pacientes que padecen los efectos derivados de la respuesta biológica al estrés oxidativo (EOx) a la nanotoxicidad tisular, el envejecimiento y la senescencia celular.

El sistema Biow es un producto biotecnológico regenerador del exposoma y son de especial interés para el desarrollo de este sistema, las temáticas vanguardistas de la investigación biomédica sobre el exposoma, el plasma atmosférico frío y la nanomedicina, que inician ya su desembarco en la práctica médica.

Los resultados de los estudios clínicos realizados hasta la fecha con el sistema Biow en voluntarios sanos (1), y en colaboración con la Universidad de Oviedo, nos permiten afirmar que el sistema Biow adquiere un papel muy relevante en el desarrollo de la medicina preventiva. En este sentido, su uso como coadyuvante de amplio espectro sobre la función celular incluiría la mejora sintomática de fenotipos dependientes de cambios en el metabolismo celular regulados a nivel mitocondrial por la activación aniónica. Además, como biomodulador del exposoma muestra un efecto protector de la matriz pericelular, siendo útil para el manejo preventivo de los efectos adversos derivados de la nanotoxicidad y la biotoxicidad de los tejidos, mucosas y fluidos corporales, reforzando el concepto de un espacio intersticial extracelular libre de nanopartículas, con efecto pro-regenerativo y reparador de la función celular. Así mismo, estos estudios nos han permitido definir el modo de uso del sistema, resaltando la importancia de su uso diario, continuado y prolongado durante el sueño reparador, reduciendo el período de latencia del sueño y los despertares que afectan a la calidad del sueño y finalmente aumentar los niveles de descanso y recambio celular nocturno con menor desgaste en el metabolismo celular. Estos efectos sobre el sueño han sido observados en colaboración con la Unidad del Sueño de la Clínica Universitaria de Navarra.

Actualmente, mantenemos activos ensayos clínicos en fase de reclutamiento en colaboración con instituciones y centros sanitarios, públicos y privados, para definir las evidencias científicas de base clínica y molecular que soportan los beneficios sobre la salud y el bienestar de las personas usuarias del sistema Biow. Dichos ensayos tienen especialmente presentes aquellas situaciones que precisan un incremento de la producción de energía mitocondrial, reducción del desgaste celular y una mejora de la sintomatología del EOx, incluyendo aquellas funciones respiratorias anormales que se acompañan de dificultad para conciliar el sueño, varios subtipos de insomnio, apnea, tos, obstrucción nasal, rinorrea, sobreproducción de moco, y dificultad para respirar.

Asimismo, son de gran interés los ensayos clínicos en la prevención y alivio de síntomas relacionados con funciones musculares anormales tipo fatiga o debilidad, espasticidad, contractura, dolor y desgarro muscular, así como, la sarcopenia. Así mismo, destacar el ensayo sobre la apnea obstructiva crónica de grado moderado.

En relación con la diabetes y sus complicaciones, es bien conocido que la variabilidad glucémica ha surgido como un factor de riesgo independiente para las complicaciones de la diabetes, y posiblemente ejerza dicho efecto a través del EOX (2). Además, existen evidencias científicas que apoyan la asociación entre EOX con la dinámica de la longitud de los telómeros (TL) y la relación con los componentes del síndrome metabólico (SM), durante el envejecimiento (3). Por otro lado, el EOX es bien conocido como factor desencadenante de la senescencia celular y las células senescentes se van acumulando en los tejidos como consecuencia del envejecimiento (4). Resultados preliminares de un estudio abierto con Biow dirigido a conocer el papel de diversas variables de la longitud telomérica en linfocitos circulantes, nos muestran cómo tras 100 días bajo el efecto de Biow, se detecta una mejora del perfil telomérico-celular, aventurándonos a sugerir una posible reducción de la inmunosenescencia celular.

Desde febrero del año en curso dirijo la Cátedra Universidad-Empresa en Medicina Regenerativa Avanzada que se ha creado junto con la Universidad Católica de Murcia (UCAM). A través de ella impulsamos estudios en ratones modificados genéticamente, para descifrar en mayor detalle el papel de Biow en el envejecimiento y los trastornos crónicos que lo acompañan. Así mismo, estamos tramitando la creación de una nueva cátedra en Estrés Oxidativo y Exposoma en la Universidad de Oviedo.

Los resultados de investigación se recogen en memorias, informes técnicos, comunicaciones y publicaciones científicas. Hemos de considerar que la actividad de investigación biomédica con el sistema Biow en humanos es reciente, iniciándose el reclutamiento de casos en junio del 2020 por lo que determinados resultados aún no han podido ser publicados, pero los datos si están detallados en las memorias e informes técnicos.

Adjunto información de los efectos derivados de la exposición al sistema Biow, identificando las áreas de actuación, un listado de efectos y los documentos de referencia científica que justifican dichos efectos.

CASO
PELAEZ
ENRIQUE -
10819184F

Firmado digitalmente
por CASO PELAEZ
ENRIQUE - 10819184F
Fecha: 2022.11.14
14:32:01 +01'00'

Enrique Caso Peláez., MSc.,PhD.,MD
Director Biomédico

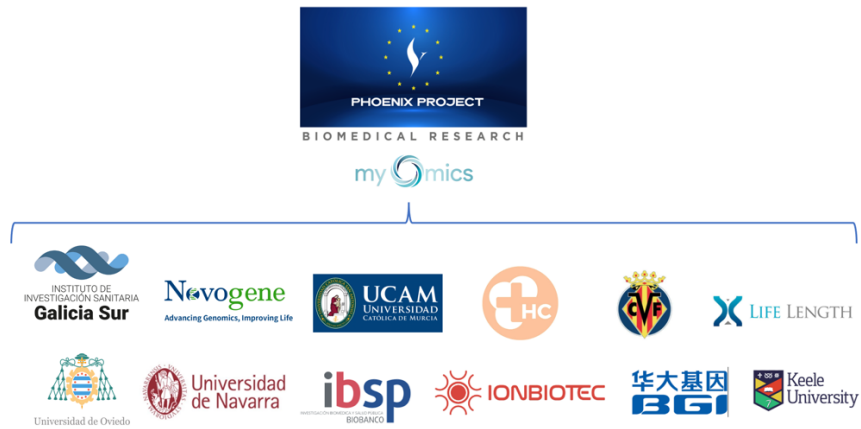
Referencias:

- (1) Antuña E, et al. Removal of Environmental Nanoparticles Increases Protein Synthesis and Energy Production in Healthy Humans. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Feb 14; 10:800011. doi: 10.3389/fbioe.2022.800011. PMID:35237574; PMCID: PMC8883322
- (2) T. Valente et al. Glycemic Variability, Oxidative Stress, and Impact on Complications Related to Type 2 Diabetes Mellitus *Curr Diabetes Rev.* 2021;17(7): e071620183816. Doi: 10.2174/1573399816666200716201550. PMID: 32674737.
- (3) G Gavia-García et al. Telomere Length and Oxidative Stress and Its Relation with Metabolic Syndrome Components in the Aging Biology (Basel). 2021 Mar 24;10(4):253. doi: 10.3390/biology10040253. PMID: 33804844. PMCID: PMC8063797.
- (4) Herbig U et al. Cellular senescence in aging primates. *Science.* 2006;311(5765, article 1257) doi: 10.1126/science.1122446.

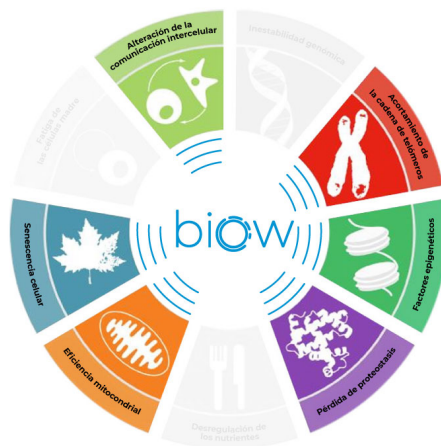
2.- Identificación de los efectos inducidos por la exposición al sistema Biow

Los efectos inducidos por la exposición prolongada y continua al sistema Biow alcanzan 11 áreas de actuación. En cada una de ellas se han descifrado los efectos inducidos por Biow a través del desarrollo de proyectos de investigación (Proyecto Phoenix) en colaboración con instituciones científicas, médicas y tecnológicas en el marco de una investigación colaborativa en red como se describe en el siguiente gráfico.

Collaborative Research



El hilo conductor de la actividad científica es el proceso natural del envejecimiento y sus patologías asociadas como consecuencia del estrés oxidativo. En este sentido, se ha observado que la exposición al sistema Biow alcanza 6 de los 9 pilares del envejecimiento, con evidencia científica y que se ilustran en la siguiente figura.



Por otro lado, hemos identificado aquellas temáticas de especialización médica de interés para el desarrollo de estudios y ensayos clínicos, y con ello potenciales casos de uso con fines preventivos, persiguiendo el alivio sintomático de pacientes. El listado de dichas patologías se muestra a continuación:

Especialidad	Patología
Neurología	E. Alzheimer
	E. Parkinson
	E. Huntington
	Esclerosis Lateral Amiotrófica
	Demencia senil
	Síndromes de ataxia-telangiectasia
	Sd. Down
Vascular	Sd. de Bloom
	Trastornos perfusión
	Isquemia
	Ateroesclerosis
Nefrología	Glomerulonefritis
	Insuficiencia renal aguda
	Insuficiencia renal crónica
Oncología	Diálisis
	Metástasis
	Quimioterapia
Toxicología	Progresión de la enfermedad
	Toxicidad renal
Dermatología	Hepatotoxicidad
	Dermatitis de contacto
Neumología	Enfisema pulmonar
	displasia broncopulmonar
	Distrés respiratorio del adulto
	EPOC
	Rinitis
	Asma bronquial
	Sd. Apnea obstructiva del sueño
	Neumopatías intersticiales
	Fibrosis quística
	Digestivo
Úlcera péptica	
Cirrosis hepática	
Insuficiencia hepática	
Hepatopatía alcohólica	
Reumatología	Amiloidosis
	Colagenosis
	LES (Lupus Eritematoso Sistémico)
	Esclerodermia
Cardiología	E. Wegener
	Miocardiopatías
	Insuficiencia cardíaca
	Muerte súbita cardíaca
	Hipertensión Arterial
Endocrinología	Ateroesclerosis
	Diabetes Mellitus tipo 2
Metabolismo y Nutrición	Síndrome Metabólico
Oftalmología	Catarata senil
Geriatría	Envejecimiento prematuro
	Sarcopenia
	Rigidez articular
	Perdida de movilidad
Ginecología	Perdidas de memoria
	Climaterio o perimenopausia

Actualmente, dos ensayos clínicos han sido aprobados por el correspondiente comité de ética de la investigación y están en fase de reclutamiento;

- Ensayo clínico, aleatorizado, prospectivo, doble ciego, sobre los efectos del enriquecimiento del exposoma endógeno en la recuperación de la función neuromuscular.
- Randomized, prospective, double-blind clinical trial on the effects of endogenous exposome enrichment in sleep-disordered breathing: snoring and obstructive sleep apnea

Con la finalidad de aumentar el conocimiento de efectos inducidos por la exposición al sistema Biow, la inclusión de tecnologías ómicas como la genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica y metagenómica, constituyen la estrategia de análisis de variables genético-moleculares en dichos ensayos

A continuación, se listan los efectos de la exposición al sistema Biow, organizados por ámbitos de actuación y que en el siguiente apartado se desarrollarán de manera separada.

2.1.- Nanopartículas

- Eliminación de material particulado en suspensión en espacios interiores
- Regeneración del exposoma personal externo
- Definición e identificación del espacio libre de nanopartículas -BiowSpace-
- Prevención de la nanotoxicidad y biotoxicidad

2.2.- Biodisponibilidad y Activación Celular

- Biodisponibilidad celular de iones O^{-2}
- Activación celular aniónica

2.3.- Estrés Oxidativo

- Reducción significativa y directamente dependiente del tiempo de los daños oxidativos en las proteínas, tanto en hombres como en mujeres
- Prevención de la oxidación de las membranas biológicas
- Reducción del estrés oxidativo del exposoma incluyendo el entorno celular y intercelular
- Optimización de la actividad de los orgánulos intracelulares más susceptibles al estrés oxidativo, que resalta el importante papel de Biow en la prevención del progresivo y prematuro agotamiento celular.
- Mantenimiento de la actividad antioxidante, sin desgaste de las defensas antioxidantes propias de las células, facilitando la protección antioxidante contra el envejecimiento

2.4.- Proteostásis

- Incremento de la síntesis de proteínas de forma dependiente del tiempo.
- Construcción de tejidos y otras funciones fundamentales para el buen funcionamiento de nuestro cuerpo.

2.5.- Energía Mitocondrial

- Incrementa la síntesis de ATP mitocondrial y reduce la generación de radicales libres.
- Garantiza la eficacia y la eficiencia celular por un funcionamiento mitocondrial mejorado y una actividad metabólica eficiente.

- Contrarresta la mayor sensibilidad a la degeneración neuronal en el envejecimiento, condicionada por la alta demanda de ATP en combinación con las mitocondrias disfuncionales
 - Previene alteraciones sobre la estructura del ADN causadas por la oxidación y radicales libres especialmente en tejidos demandantes de energía (encéfalo, nervios, retina, músculo esquelético y cardíaco)
- 2.6.- Rendimiento celular
- La mejora celular para mayor facilidad para el desarrollo de las actividades diarias
 - Aprovechamiento mitocondrial.
 - Pilares de la mejora celular
- 2.7.-Inflamación
- Mantenimiento de los niveles de los factores de inflamación TNF-alfa e Interleucina 6
- 2.8.- Oxigenación y vascularización
- Optimiza la Ruta del Oxígeno para ayudar a la función respiratoria
 - Incrementa la producción de factores activadores de la respuesta a la falta de oxígeno (HIF-1alfa) en los tejidos
 - Dispara la reacción en cadena de moléculas VEGF y EPO que estimula la angiogénesis e incrementa el número de glóbulos rojos
 - Facilita la recuperación del metabolismo y la supervivencia de las células que ven reducida la disponibilidad de oxígeno
 - La respuesta rápida para prevenir problemas circulatorios.
 - Mejora la respuesta hormonal para la formación de glóbulos rojos transportadores de oxígeno, sin alterar la viscosidad sanguínea
- 2.9.- Función linfocitaria
- Mejora de la salud inmunológica por su efecto restaurador y rejuvenecedor de la función mitocondrial de linfocitos.
- 2.10.- Función eritrocítica
- Mejora la respuesta hormonal para la formación de glóbulos rojos transportadores de oxígeno, sin alterar la viscosidad sanguínea.
- 2.11.- Inmunosenescencia
- Tendencia a la disminución de linfocitos senescentes circulantes, previniendo el letargo prematuro de las células y contrarrestando la inflamación sostenida y/o acelerada

Para reforzar y ampliar el conocimiento de los efectos del sistema Biow, la cátedra de Medicina Regenerativa Avanzada trabajamos en el proyecto “Enhancement of the regeneration capacity and amelioration of aging hallmarks after exposure to Biow 100M” desarrollado en ratones genéticamente envejecidos.

En este marco de actividades, tenemos en marcha un proyecto abierto de entrevistas para descifrar los factores más relevantes del exposoma externo personal.

La finalidad última de identificar estos efectos que definen el mecanismo de acción del sistema, es aportar la evidencia científica apropiada que sostenga alegaciones en salud y refuerce la estrategia de bio-Marketing de la empresa.

3. Evidencia científica de los efectos derivados de la exposición al sistema Biow

3.1.- Nanopartículas

Efectos Biow

- Eliminación de material particulado en suspensión en espacios interiores
- Regeneración del exposoma personal externo
- Definición e identificación del espacio libre de nanopartículas -BiowSpace-
- Prevención de la nanotoxicidad y biotoxicidad

Método

Detección de material particulado en suspensión (tamaños 0.3; 0.5; 1.0; 2.5; 5.0 and 10) mediante un equipo contador portátil PC-220 (TROTEC) (Calibrated Serial number: 17020034, SGS Tecno SA & Comfort Direct) en muestras medioambientales de espacios interiores de 23.75 m³ a 183.60 m³.

Resultados/Comentario

El nivel de materia particulada (PM) en suspensión (tamaños 0.3; 0.5; 1.0; 2.5; 5.0 y 10) se probó utilizando un contador de partículas portátil PC-220 (TROTEC) (Número de serie calibrado: 17020034, SGS Tecno SA & Comfort Direct) en muestras ambientales interiores de dimensiones de espacio que oscilaron entre 23,75 m³ de volumen mínimo y 183,60 m³ de volumen máximo. También se realizaron pruebas sobre el caudal volumétrico, la velocidad del aire y la temperatura de salida del sistema. Antes de iniciar el estudio, se realizaron pruebas de detección de nanopartículas. Los ensayos realizados en muestras ambientales para PM en suspensión mostraron una reducción para PM de calibre 0,3; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 y 10, en espacios interiores después de 30/40/60 minutos (Tabla 1).

Tabla 1. Nivel de nanopartículas antes de iniciar el sistema de filtrado de aire y después de 30/40/60 minutos de uso continuo del sistema de filtrado de aire. Resultados de la prueba de detección de material particulado (PM) de diferentes tamaños (0.3um, 0.5um, 1.0um, 2.5um, 5.0um, 10um) en el aire presente en varios espacios interiores; 25 m³, 70 m³, 122 m³; A) antes del sistema de filtrado de aire; B) después de 30/40 minutos y C) después de 60 minutos de sistema de filtrado de aire continuo

PM size	Basal				After 30/40 min				After 60 min			
	25m ³	70m ³	122m ³	Average	25m ³	70m ³	122m ³	Average	25m ³	70m ³	122m ³	Average
0.3um	46117	98454	62058	68876,33	4827	27694	23873	18798,00	752	22107	13964	12274,33
0.5um	12451	40105	15729	22761,67	953	10954	7086	6331,00	143	8451	4289	4294,33
1.0um	2502	8077	2886	4488,33	151	2380	1222	1251,00	54	1500	761	771,67
2.5um	313	965	399	559	31	269	170	156,67	2	176	139	105,67
5.0um	82	151	129	120,67	3	52	63	39,33	1	26	37	21,33
10um	34	57	58	49,67	2	14	41	19,00	1	12	21	11,33

La Figura 1 muestra el nivel de diferentes tamaños de PM antes de iniciar el sistema (Figura 1A), después de 30/40 minutos (Figura 1B) y después de 60 minutos (Figura 1C). Los controles y pruebas sobre el caudal volumétrico, la velocidad del aire y la temperatura de salida del sistema fueron 156,8 m³ / h, 224,5 m³ / h y 284,7 m³ / h para un caudal medio durante el funcionamiento del sistema a velocidades 1, 2 y 3, respectivamente, y una temperatura de 24,8°C +/- 0,5°C. Los resultados de este estudio muestran que las nanopartículas en el aire interior exhiben niveles muy bajos, de hecho, el nivel de nanopartículas

alcanzado se mantuvo por debajo del límite mínimo establecido por la OMS para espacios interiores. Además, cuanto mayor sea la carga de PM en suspensión, mayor será el porcentaje de reducción obtenido con el sistema

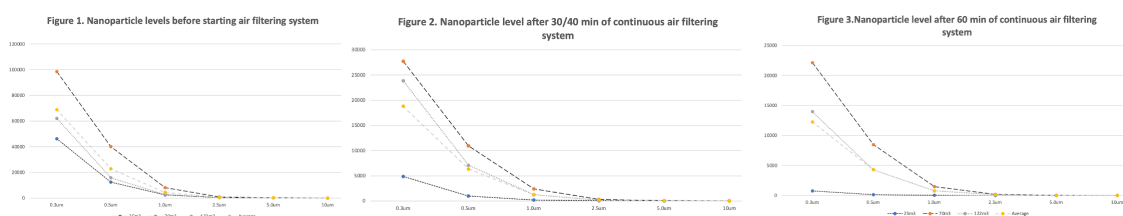


Figure 1. Niveles de nanopartículas antes de iniciar el sistema de filtrado de aire y después de 30/40/60 minutos de sistema de filtrado de aire continuo. Resultados de la prueba de detección de material particulado (0.3um, 0.5um, 1.0um, 2.5um, 5.0um, 10um) en el aire presente en varios espacios interiores; 25 m³ (punteado grueso), 70 m³ (punteado grueso), 122 m³ (punteado fino) y el valor medio (punteado fino). A) antes del sistema de filtrado de aire; B) después de 30/40 minutos y C) después de 60 minutos de sistema de filtrado de aire continuo

La reducción del nivel particulado en suspensión define el espacio BiowSpace y constituye un efecto regenerador del exposoma personal externo, previniendo así, los efectos primarios de la nanotoxicidad inhalada, ingerida o absorbida a través de la piel incluyendo:

- La toxicidad tisular y celular, estrés oxidativo, daño del ADN e inflamación de los tejidos *in situ*
- La toxicidad generalizada, inflamación sistémica y alteración de funciones celulares por el depósito de nanopartículas en tejidos y órganos

Evidencia científica

- Proyecto científico:
“Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos” IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Informe Resultados 65 casos. A Coto.BIOWGlobal.pdf.* Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Comunicación científica:
Cold atmospheric plasma-activated air modulates oxidative response to exposome, inducing tissue phenotype resilience. International Conference on Plasma Medicine (ICPM003 2021: 15. August 09-10, 2021 in New York, United States
- Publicación indexada
Antuña E, et al. Removal of Environmental Nanoparticles Increases Protein Synthesis and Energy Production in Healthy Humans. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Feb 14; 10:800011. doi: 10.3389/fbioe.2022.800011. PMID: 35237574; PMCID: PMC8883322

3.2.- Biodisponibilidad y Activación Celular

Efectos Biow:

- Biodisponibilidad celular de iones O^{-2}
- Activación celular aniónica

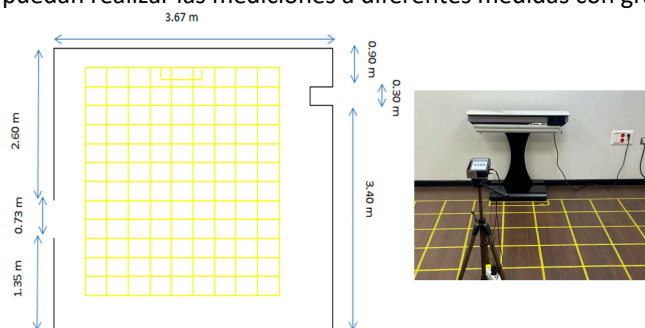
Método

Los estudios del efecto biow se realizaron en células polimorfonucleares sanguíneas, concretamente linfocitos periféricos circulantes, aislados mediante centrifugación en gradiente de densidad a partir de sangre total.

Las muestras de sangre se extrajeron por venopunción después de una noche de ayuno. Todas las muestras de sangre venosa se obtuvieron antes de las 10:00 a.m. para evitar la variación circadiana. Las muestras de sangre recogidas se fraccionaron en plasma eritrocitos y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en un gradiente Ficoll-Paque Plus (Ficoll-Paque Plus GE Healthcare) y almacenadas a $-80^{\circ}C$ hasta su posterior análisis, como se ha descrito previamente descrito anteriormente (de Gonzalo-Calvo et al., 2010, 2012). El método de Bradford (Bradford, 1976) se usó para medir las concentraciones de proteínas plasmáticas

Generación de aniones biodisponibles

Para la realización de este estudio se hicieron mediciones de iones, antes y después de la instalación de la unidad BIOW 100 a diferentes velocidades de funcionamiento. Las pruebas se realizaron en la Sala de Ensayos 3 de Biow, situada en Km 7 AS-266, 33192, Asturias. La sala tiene unas dimensiones de 16,88 m² y tiene una altura de 2,40 m². Está diseñada de manera que el suelo está dividido en cuadrículas de 30x30, de tal manera que se puedan realizar las mediciones a diferentes medidas con gran precisión.

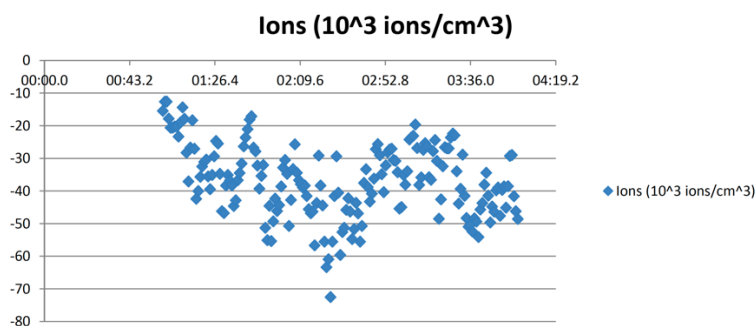


Resultados/Comentario

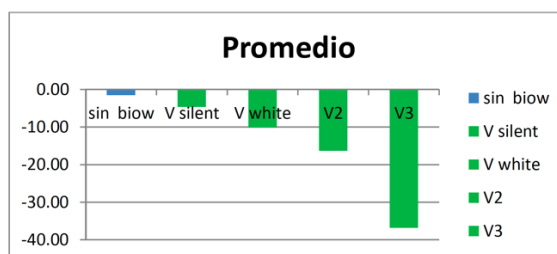
Los resultados moleculares obtenidos en linfocitos circulantes aislados de sangre total, así como la detección de cambios en proteínas plasmáticas, demuestran que la transmisión en flujo laminar directo de concentraciones bajas de aniones de O^{-2} , facilita su absorción por la piel y mucosas y que dichos aniones alcanzan el torrente sanguíneo y se distribuyen por los tejidos, confirmando la biodisponibilidad celular de aniones O^{-2} como componentes potencialmente activos para los procesos biológicos Redox.

Los resultados sobre la capacidad energética de la célula, la síntesis de proteínas y los sistemas de defensa antioxidante entre otros, confirman la activación celular aniónica inducida por Biow.

Los datos obtenidos de los muestreos realizados sobre la medición de aniones se representan gráficamente:



BIOW 100					
	sin biow	V silent	V white	V2	V3
Promedio	-1.49	-4.64	-10.16	-16.33	-36.78



El uso de la unidad BIOW 100 incrementa el número de iones negativos en el ambiente. En líneas generales, el incremento de este tipo de iones es mayor a mayor velocidad de funcionamiento de la unidad.

Evidencia científica

- Proyecto científico:
“Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos” IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Informe Resultados 65 casos. A Coto.BIOWGlobal.pdf.* Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Informe sobre emisión de aniones biodisponibles Biow60 e individual Biowspace iones.pdf. Analiza Calidad*
- *Informe sobre emisión de aniones biodisponibles Biow60 iones.pdf Analiza Calidad*
- *Informe sobre emisión de aniones biodisponibles Biow100 iones.pdf Analiza Calidad*
- Comunicación científica:
Cold atmospheric plasma-activated air modulates oxidative response to exposome, inducing tissue phenotype resilience. International Conference on Plasma Medicine (ICPM003 2021: 15. August 09-10, 2021 in New York, United States
- Publicación indexada
Antuña E, et al. Removal of Environmental Nanoparticles Increases Protein Synthesis and Energy Production in Healthy Humans. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Feb 14; 10:800011. doi: 10.3389/fbioe.2022.800011. PMID: 35237574; PMCID: PMC8883322

3.3.- Estrés Oxidativo

Efectos Biow

- Reducción significativa y directamente dependiente del tiempo de los daños oxidativos en las proteínas, tanto en hombres como en mujeres.
- Prevención de la oxidación de las membranas biológicas.
- Reducción del estrés oxidativo del exposoma incluyendo el entorno celular y intercelular
- Optimización de la actividad de los orgánulos intracelulares más susceptibles al estrés oxidativo, resaltando el importante papel de Biow en la prevención del progresivo y prematuro agotamiento celular.
- Mantenimiento de la actividad antioxidante, sin desgaste de las defensas antioxidantes de las células facilitando la protección antioxidante contra el envejecimiento.

Método

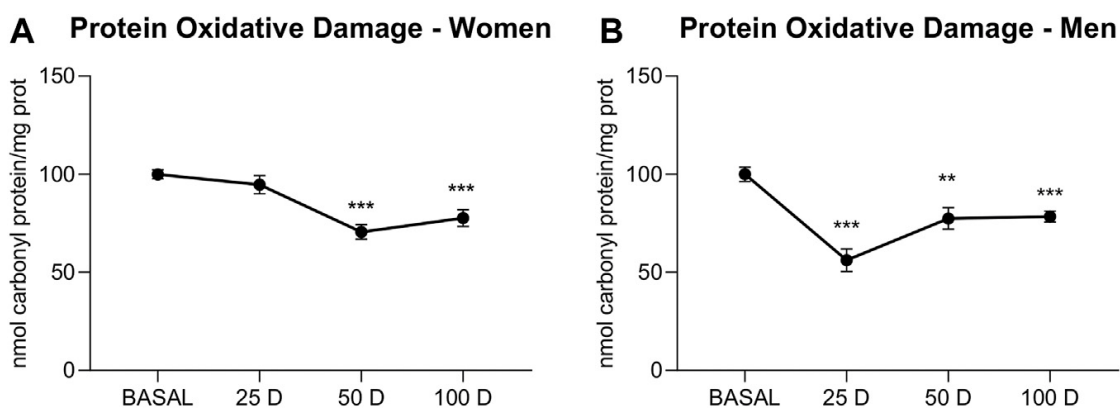
El daño oxidativo de las proteínas (DP) se midió en el plasma utilizando los métodos descritos por Levine et al. (Levine et al., 1990), con modificaciones de Coto-Montes y Hardeland (Coto-Montes y Hardeland, 1999), para la determinación de las concentraciones de proteínas carboniladas. Los resultados se presentan como nmol de proteína carbonilada/mg de proteína.

La actividad antioxidante total (AAT) se determinó en el plasma mediante utilizando el método ABTS/H₂O₂/HRP (Arnao et al., 2001), que fue modificado en nuestro laboratorio para muestras de plasma (de Gonzalo-Calvo et al., 2010, 2012). Los resultados se expresan como equivalentes de mg Trolox/g de proteína.

Resultados/Comentario

Disminución significativa en el daño proteico (PD) en todos los grupos Biow, aunque con diferencias temporales en cuanto al género, ya que los hombres mostraron una reducción significativa a partir de los 25 días, mientras que en las mujeres se retrasó hasta los 50 días.

Resultados en 58 casos:



Resultados en 65 casos:

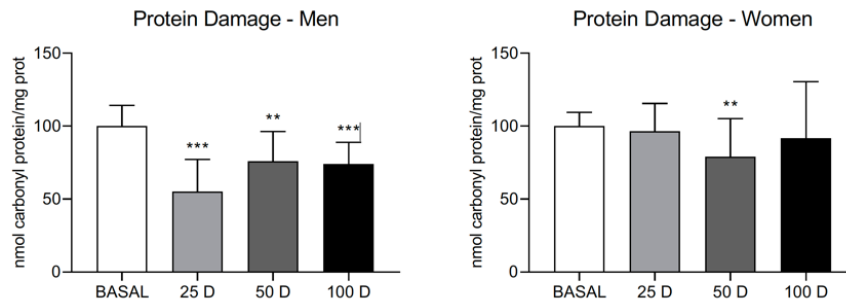
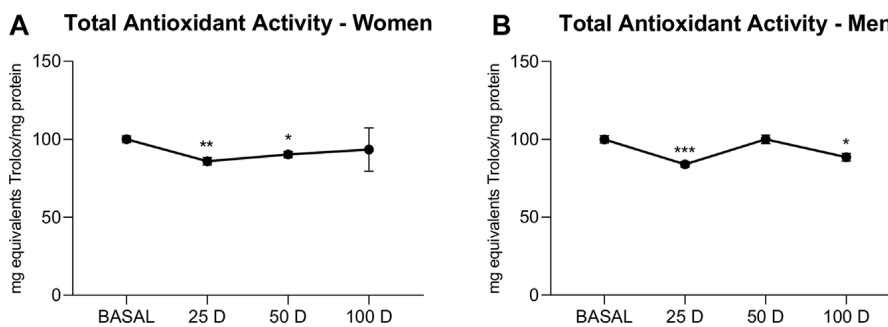


Figura 1. Daño de proteínas en hombres y mujeres.

La actividad antioxidante total (TAA) mostró una tendencia descendente generalizada en los grupos de Biow que solo fue significativa a los 25 y 100 días, tanto en hombres (25 días $p < 0,01$; 100 días $p < 0,05$) como en mujeres (25 días $p < 0,01$; 100 días $p < 0,001$).

Resultados en 58 casos:



Resultados en 65 casos

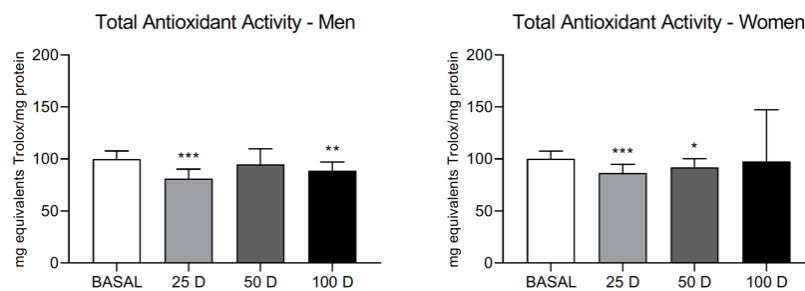


Figura 2. Actividad antioxidante total en hombres y mujeres.

El daño oxidativo a nivel de desoxinucleótidos y lípidos reduce significativamente tanto la calidad de vida como las perspectivas de salud de la población sometida a estos efectos. El aumento de la carbonilación de proteínas media el daño oxidativo en las membranas biológicas.

El patrón de reducción del daño oxidativo de las proteínas inducido por Biow difiere en el tiempo entre hombres y mujeres.

Es remarcable la variabilidad del daño oxidativo y de la actividad antioxidante detectada en mujeres a los 100 días de la exposición al Biow.



Evidencia científica

- Proyecto científico:
“Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos” IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Informe Resultados 65 casos. A Coto.BIOWGlobal.pdf.* Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Comunicación científica:
Cold atmospheric plasma-activated air modulates oxidative response to exposome, inducing tissue phenotype resilience. International Conference on Plasma Medicine (ICPM003 2021: 15. August 09-10, 2021 in New York, United States
- Publicación indexada
Antuña E, et al. Removal of Environmental Nanoparticles Increases Protein Synthesis and Energy Production in Healthy Humans. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Feb 14; 10:800011. doi: 10.3389/fbioe.2022.800011. PMID: 35237574; PMCID: PMC8883322

3.4.- Proteostasis

Efectos Biow

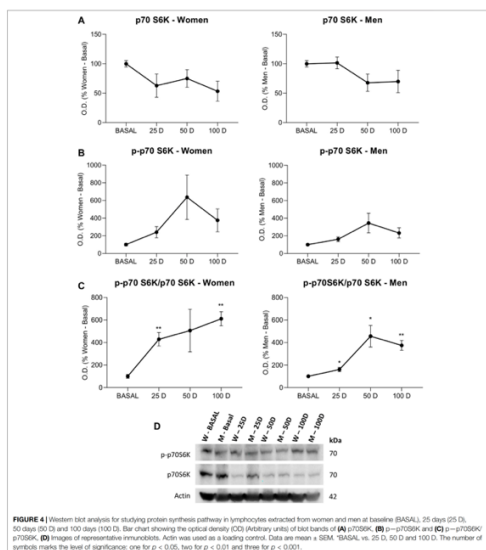
- Incremento de la síntesis de proteínas de forma dependiente del tiempo.
- Construcción de tejidos y otras funciones fundamentales para el buen funcionamiento de nuestro cuerpo.

Método

Inmunoensayo Western Blot. Para los diferentes inmunoensayos de Western Blot, los tejidos homogeneizados de tejido (50 µg de proteína por muestra) se mezclaron con tampón de muestra Laemmli (BioRad Laboratories, Inc, CA, Estados Unidos). Las muestras se fraccionaron mediante SDS-PAGE a 200 V. Tras la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno a 350 mA (Immobilon TM-P; Millipore Corp., MA, Estados Unidos). La β-actina (proteína típica de proteína de mantenimiento) no mostró variaciones significativas en sus niveles; por lo tanto, se utilizó para asegurar una carga igual. Las membranas de membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios anticuerpos primarios: p-70S6 quinasa (9.202, Cell Signaling); fosfop 70S6 quinasa (9.206, Cell Signaling); CI-20 (NDUFB8) (ab110242, Abcam, Cambridge, Reino Unido); CII-30 (SDHB) (ab14714, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y CV (ATP5A) (ab14748, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos). Las membranas de membranas se revelaron utilizando un sustrato de peroxidasa de rábano picante (WBKLS0500, Millipore Corp., Darmstadt, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó el software Image Studio Lite 5.2.5 (LI-COR Biosciences, Nebraska, Estados Unidos) para el análisis cuantitativo.

Resultado/Comentario

Síntesis de proteínas. La proteína P70S6K se activa por fosforilación en la treonina 389 (p-p70S6K), que induce la síntesis de proteínas y se usa comúnmente como marcador de activación de mTOR. Pero esta activación depende directamente de la cantidad de p70S6K total en el medio, por lo que la relación p-p70S6K / p70S6K es el indicador real de la activación de la síntesis de proteínas (Figura 4). Los niveles de expresión de p70S6K mostraron una clara disminución en los grupos tratados con BIOW que fue progresiva en los hombres y abrupta a partir de los 25 días en las mujeres (Fig. 4A). La fosforilación de p70S6K mostró resultados análogos en todo momento y en ambos sexos (Fig. 4B). La relación mostró un aumento gradual en el tiempo en los hombres que fue equivalente en las mujeres, aunque a los 50 días las mujeres mostraron una disminución inexplicable que no impidió una rápida recuperación a los 100 días, alcanzando niveles más altos que los hombres (Fig. 4C). Así, la comparación entre sexos mostró que en las mujeres los incrementos fueron abruptos con valores muy superiores a los observados en los hombres.



En general las funciones de las proteínas incluyen diversos niveles:

- Plástica, estructural o de construcción: forman parte de las estructuras corporales, suministran el material necesario para el crecimiento y la reparación de tejidos y órganos del cuerpo. P. ej. la queratina está presente en la piel, las uñas y el pelo; el colágeno está presente en los huesos, los tendones y el cartílago, y la elastina, se localiza fundamentalmente en los ligamentos.
- Reguladora: algunas proteínas colaboran en la regulación de la actividad de las células. Ciertas hormonas son de naturaleza proteica (insulina, hormona del crecimiento...), muchas enzimas son proteínas que favorecen múltiples reacciones orgánicas y algunos neurotransmisores tienen estructura de aminoácido o derivan de los aminoácidos y regulan la transmisión de impulsos nerviosos.
- Defensiva: forman parte del sistema inmunológico o defensas del organismo (anticuerpos, inmunoglobulinas...).
- Intervienen en procesos de coagulación: fibrinógeno, trombina.... impiden que al dañarse un vaso sanguíneo se pierda sangre.
- Transporte de sustancias: transportan grasas (apoproteínas), el oxígeno (hemoglobina), también facilitan la entrada a las células (transportadores de membrana) de sustancias como la glucosa, aminoácidos, etc.
- Energética: cuando el aporte de hidratos de carbono y grasas resulta insuficiente para cubrir las necesidades energéticas, los aminoácidos de las proteínas se emplean como combustible energético (1 gramo de proteína suministra 4 Kcal).

Evidencia científica

- Proyecto científico:
“Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos” IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Informe Resultados 65 casos. A Coto.BIOWGlobal.pdf*. Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Comunicación científica:



Cold atmospheric plasma-activated air modulates oxidative response to exposome, inducing tissue phenotype resilience. International Conference on Plasma Medicine (ICPM003 2021: 15. August 09-10, 2021 in New York, United States

- Publicación indexada

Antuña E, et al. Removal of Environmental Nanoparticles Increases Protein Synthesis and Energy Production in Healthy Humans. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Feb 14; 10:800011. doi: 10.3389/fbioe.2022.800011. PMID: 35237574; PMCID: PMC8883322

5.- Energía Mitocondrial

Efectos Biow

- Incrementa la síntesis de ATP mitocondrial y reduce la generación de radicales libres.
- Garantiza la eficacia y la eficiencia celular por un funcionamiento mitocondrial mejorado y una actividad metabólica eficiente.
- Contrarresta la mayor sensibilidad a la degeneración neuronal en el envejecimiento, condicionada por la alta demanda de ATP en combinación con las mitocondrias disfuncionales
- Previene alteraciones sobre la estructura del ADN causadas por la oxidación y radicales libres especialmente en tejidos demandantes de energía (encéfalo, nervios, retina, músculo esquelético y cardíaco)

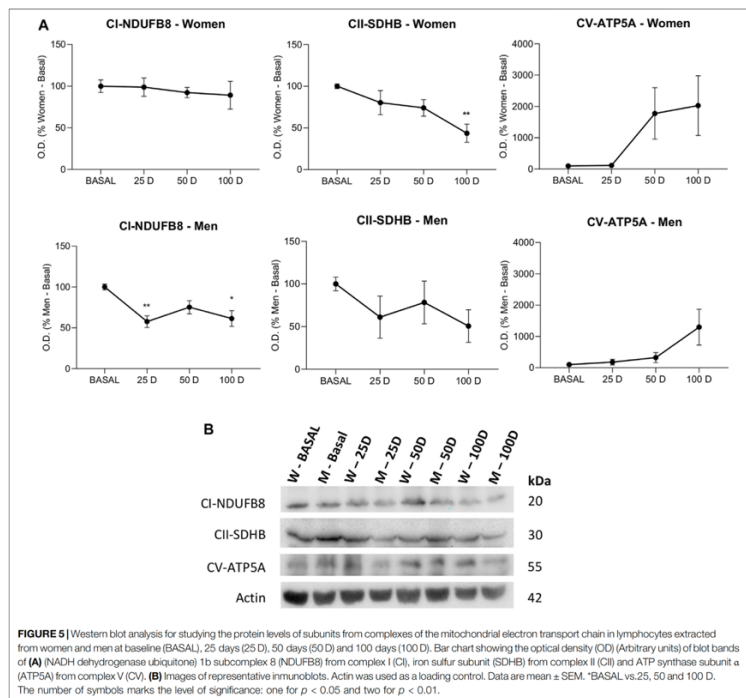
Método

Inmunoensayo Western Blot. Para los diferentes inmunoensayos de Western Blot, los tejidos homogeneizados de tejido (50 µg de proteína por muestra) se mezclaron con tampón de muestra Laemmli (BioRad Laboratories, Inc, CA, Estados Unidos). Las muestras se fraccionaron mediante SDS-PAGE a 200 V. Tras la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno a 350 mA (Immobilon TM-P; Millipore Corp., MA, Estados Unidos). La β-actina (proteína típica de proteína de mantenimiento) no mostró variaciones significativas en sus niveles; por lo tanto, se utilizó para asegurar una carga igual. Las membranas de membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios anticuerpos primarios: p-70S6 quinasa (9.202, Cell Signaling); fosfo p 70S6 quinasa (9.206, Cell Signaling); CI-20 (NDUFB8) (ab110242, Abcam, Cambridge, Reino Unido); CII-30 (SDHB) (ab14714, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y CV (ATP5A) (ab14748, Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos). Las membranas de membranas se revelaron utilizando un sustrato de peroxidasa de rábano picante (WBKLS0500, Millipore Corp., Darmstadt, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó el software Image Studio Lite 5.2.5 (LI-COR Biosciences, Nebraska, Estados Unidos) para el análisis cuantitativo.

Los niveles de trifosfato de adenosina (ATP) se determinaron utilizando un kit bioluminiscente de ATP disponible en el mercado (FLAA, Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos). El ensayo se llevó a cabo según las indicaciones del fabricante. Los resultados se expresan en nmol de ATP/g de proteína.

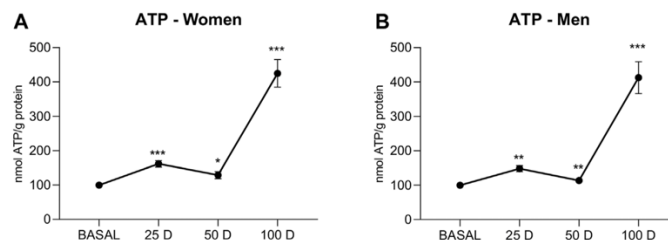
Resultados/Comentario:

La inmunotransferencia reveló que los complejos mitocondriales I, II y V variaron ligeramente su actividad a lo largo del tiempo, mostrando un patrón similar en ambos sexos. Mientras que los complejos I y II mostraron pequeñas reducciones, siendo significativa esta reducción en el complejo I para los hombres (25 días $p < 0,001$ 100 días $p < 0,05$) y en el complejo II para las mujeres (100 días $p < 0,01$), el complejo V mostró un aumento de su actividad, principalmente después de 50 días en ambos sexos sin alcanzar niveles significativos



La fosforilación oxidativa es un proceso bioquímico que ocurre en las células. La cadena de transporte de electrones forma un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna, lo que promueve la síntesis de ATP por medio de la quimiosmosis. Es el proceso metabólico final (catabolismo) de la respiración celular, tras la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico.

Hasta el 90 % de la energía celular en forma de ATP es producida por la fosforilación oxidativa que utiliza energía liberada por la oxidación de nutrientes para producir ATP. Para caracterizar los niveles de energía, se estudió la producción de ATP. El aumento de los niveles de ATP mostró un patrón similar similar en ambos sexos, con un aumento significativo respecto a los niveles basales a los 25 días de tratamiento ($p < 0,001$ para las mujeres; $p < 0,01$ para los hombres), una disminución de nuevo a los 50 días ($p < 0,05$ para las mujeres; $p < 0,01$ para los hombres), y un pico abrupto a los 100 días de tratamiento con Biow ($p < 0,001$ en ambos sexos), lo que representa un de cuatro veces en los hombres y las mujeres en comparación con los niveles de referencia.



Los tejidos con alta demanda de energía (p. ej., encéfalo, nervios, retina, músculo esquelético y cardíaco) son particularmente vulnerables a los defectos de la fosforilación oxidativa y las manifestaciones clínicas

más comunes son: Convulsiones, Hipotonía, Oftalmoplejía, Episodios semejantes a un accidente cerebrovascular, Debilidad muscular, Estreñimiento grave, Miocardiopatía.

Hay que destacar que en nuestro estudio no se produjeron variaciones significativas en la expresión de la OXPHOS aunque si en su actividad, lo que indica un aumento de su eficacia. Esta diferencia esencial se correlaciona directamente con la producción de ATP, que aumenta significativamente con la reducción de las nanopartículas ambientales. Por lo tanto, la reducción observada de la expresión de estos complejos es una prueba de una mayor eficiencia mitocondrial. Muchos artículos han demostrado una disminución de la eficiencia mitocondrial en condiciones de estrés como el envejecimiento (González-Freire et al., 2018) y la enfermedad. Se sabe que varios agentes aumentan la producción de ATP, incluyendo fármacos que permiten la recuperación de enfermedades y tratamientos que inducen una sobreproducción de energía en individuos sanos. Así, el ejercicio físico (Vigh-Larsen et al., 2021) y diversos antioxidantes, como la melatonina y la vitamina D (Latham et al., 2021; Reiter et al., 2021), han demostrado tener un papel dinamizador en las mitocondrias al aumentar la producción de ATP en estos orgánulos.

El sistema Biow utilizado en el presente estudio, ha demostrado mejorar la producción de energía celular y los resultados parecen imitar un efecto antioxidante a nivel celular que permiten concluir que la exposición al sistema Biow conduce a una mejora de la eficacia y la eficiencia celular, incluso en individuos sanos.

Evidencia científica:

- Proyecto científico:
“Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos” IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Informe Resultados 65 casos. A Coto.BIOWGlobal.pdf* Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Informe Resumen resultados BIOW Villarreal Oct 2022*
- Comunicación científica:
Cold atmospheric plasma-activated air modulates oxidative response to exposome, inducing tissue phenotype resilience. International Conference on Plasma Medicine (ICPM003 2021: 15. August 09-10, 2021 in New York, United States
- Publicación indexada
Antuña E, et al. Removal of Environmental Nanoparticles Increases Protein Synthesis and Energy Production in Healthy Humans. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Feb 14; 10:800011. doi: 10.3389/fbioe.2022.800011. PMID: 35237574; PMCID: PMC8883322

3.6.- Rendimiento celular

Efectos Biow

- La mejora celular para mayor facilidad para el desarrollo de las actividades diarias
- Aprovechamiento mitocondrial.
- Pilares de la mejora celular

Método

Estudio del efecto de BLOW sobre la capacidad mitocondrial y la síntesis de proteínas. En el siguiente estudio se ha realizado en 9 jugadores de fútbol del Villarreal FC, que denominaremos de aquí en adelante como:

- Centrocampista A, Centrocampista B, Centrocampista C
- Defensa A, Defensa B
- Delantero A, Delantero B, Delantero C
- Portero

Se han realizado varias extracciones de sangre en los tiempos Basal, 72H, 15D, 23D y 34D. Con las muestras obtenidas se realizaron varios ensayos para determinar:

- La expresión de los complejos mitocondriales.
- La producción de ATP.
- La síntesis de proteínas.

Resultados/Comentario

1.- Expresión de los complejos mitocondriales

La mayor síntesis de ATP celular se alcanza a través de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria compuesto fundamentalmente por complejos multipéptidicos: Complejo I, Complejo II, Complejo III, Complejo IV, Complejo V.

El descenso de la expresión de los complejos mitocondriales a igual producción de ATP implica un mayor aprovechamiento mitocondrial.

Complejo I

Se observó un descenso en la expresión del complejo I:

- A las 72h en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 15D en el 56% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A.
- A los 23D en el 56% de los jugadores Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A.
- A los 34D en el 33% de los jugadores: Centrocampista B.

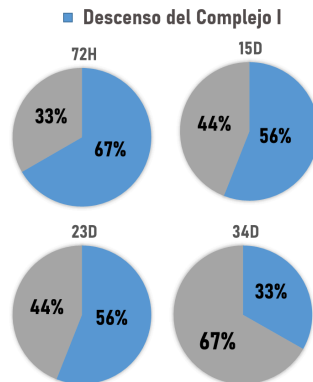


Figura 1: Desciende el Complejo I a las 72h en un 66,67% de los casos estudiados; A los 15D en un 55,56% de los casos estudiados; A los 23D en un 55,56% de los casos estudiados; A los 34D en un 33,33% de los casos estudiados.

Complejo II

Se observó un descenso en la expresión del complejo II:

- A las 72h en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 15D en el 100% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Portero, Centrocampista C, Delantero B, Delantero C.
- A los 23D en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Centrocampista C, Delantero B.
- A los 34D en el 33% de los jugadores: Centrocampista B.

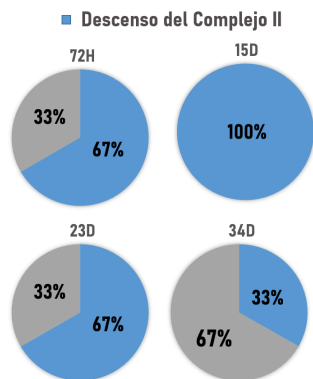


Figura 2: Desciende el Complejo II a las 72h en un 66,67% de los casos estudiados; A los 15D en un 100% de los casos estudiados; A los 23D en un 66,67% de los casos estudiados; A los 34D en un 33,33% de los casos estudiados.

Complejo III

Se observó un descenso en la expresión del complejo III:

- A las 72h en el 56% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 15D en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Portero, Centrocampista C.
- A los 23D en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Centrocampista C, Delantero B.
- A los 34D en el 33% de los jugadores: Centrocampista B.

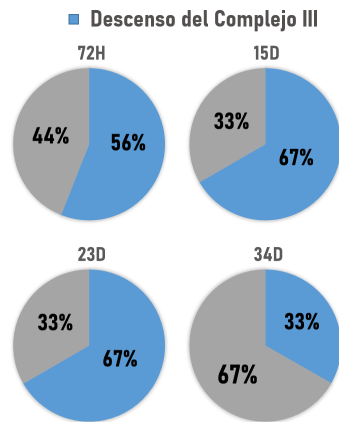


Figura 3: Desciende el Complejo III a las 72h en un 55,56% de los casos estudiados; A los 15D en un 66,67% de los casos estudiados; A los 23D en un 66,67% de los casos estudiados; A los 34D en un 33,33% de los casos estudiados.

Complejo IV

Se observó un descenso en la expresión del complejo IV:

- A las 72h en el 77% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Portero, Centrocampista C.
- A los 15D en el 44% de los jugadores: Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Centrocampista C.
- A los 23D en el 33% de los jugadores: Defensa A, Defensa B, Delantero A.
- A los 34D en el 67% de los jugadores: Centrocampista B, Delantero A.

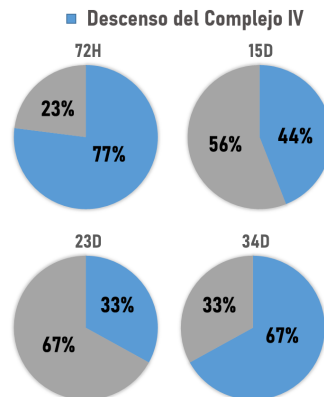


Figura 4: Desciende el Complejo III a las 72h en un 77,78% de los casos estudiados; A los 15D en un 44,44% de los casos estudiados; A los 23D en un 33,33% de los casos estudiados; A los 34D en un 66,67% de los casos estudiados.

Complejo V

- A las 72h en un 56% de los jugadores Centrocampista A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 15D en un 44% de los jugadores Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 23D en un 67% de los jugadores Centrocampista A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C, Delantero B.
- A los 34D en un 67% de los jugadores Centrocampista B, Delantero A

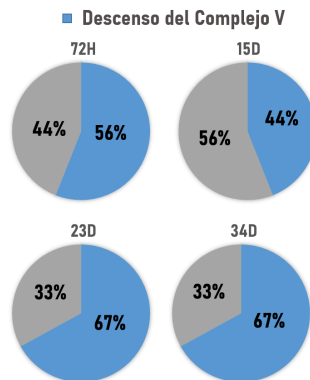


Figura 5: Desciende el Complejo III a las 72h en un 55,56% de los casos estudiados; A los 15D en un 44,44% de los casos estudiados; A los 23D en un 66,67% de los casos estudiados; A los 34D en un 66,67% de los casos estudiados

2.- Producción de ATP

El ATP que medimos necesariamente es el que resta después de que el ATP total se le descuenta el ATP gastado en las actividades diarias. Por tanto, una disminución de la concentración de ATP no implica necesariamente una menor producción de ATP, sino que puede contar con una mayor capacidad de gasto energético que el jugador puede aprovechar en cada juego.

Se observó un aumento de la concentración de ATP después de jugar un partido en la mayoría de los casos: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Portero, Delantero C.

Sin embargo, en el Centrocampista A y el Delantero B no ocurre lo esperado, sino que por sus características propias individuales la concentración de ATP después de jugar un partido disminuye.

Centrocampista A

Juega 3 partidos en el periodo en el que se realiza el estudio:

- 1 partido previo a de la extracción 72H
- 2 partidos previo a la extracción 23D

En el periodo 72H – 15D no juega ningún partido.

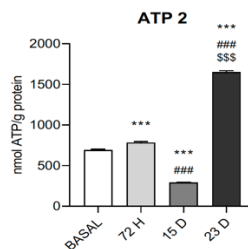


Figura 6: Niveles de ATP en el jugador "Centrocampista A"

Defensa A

4 días antes de la extracción 15D se lesiona y no juega ningún partido más en este periodo, en el que la concentración de ATP disminuye a una mayor velocidad.

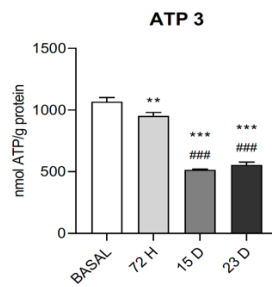


Figura 8: Niveles de ATP en el jugador "Defensa A"

Defensa B

Lesionado de larga duración que recibe el alta médica 1 mes antes de la extracción basal, el ATP disminuye a las 72H y los 15D ya que en ese periodo no juega ningún partido.

Juega antes de la extracción 23D.

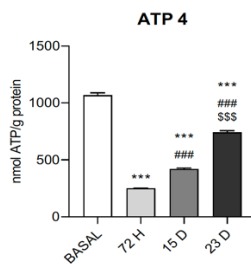


Figura 9: Niveles de ATP en el jugador "Defensa B"

Centrocampista B

Esta lesionado y no juega ningún partido, se observa como la cantidad de ATP va disminuyendo a lo largo del tiempo.

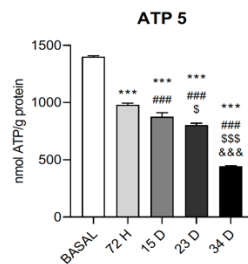


Figura 10: Niveles de ATP en el jugador "Defensa B"

Portero

Juega 3 partidos en el periodo en el que se realiza el estudio:

- 1 partido previo a de la extracción 72H
- 1 partido previo a la extracción 23D
- 1 partido previo a la extracción 34D

En el periodo 72H – 15D no juega ningún partido.

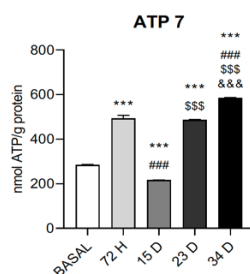


Figura 11: Niveles de ATP en el jugador "Defensa B"

Delantero C

Juega 4 partidos en el periodo en el que se realiza el estudio:

- 1 partido previo a de la extracción 72H
- 1 partido previo a la extracción 15D
- 2 partidos previo a la extracción 23D

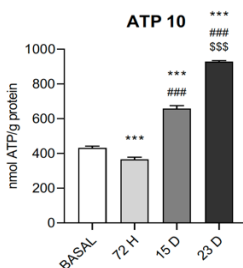


Figura 12: Niveles de ATP en el jugador "Delantero C"

3.- Síntesis de proteínas

El Centrocampista B es un lesionado de larga duración que no juega ningún partido, sigue una tendencia ascendente en la síntesis de proteínas.

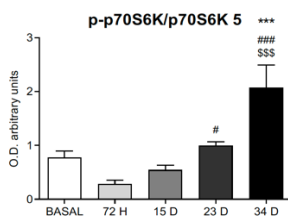


Figura 13: p-p70S6K/p70S6K en el jugador "Centrocampista B"

El Defensa A tiene una lesión previa a la extracción 15D, observamos que en ese momento la síntesis de proteínas aumenta.

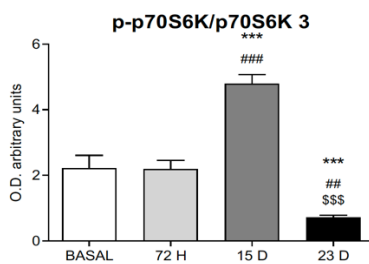


Figura 14: p-p70S6K/p70S6K en el jugador "Defensa A"

En cambio, en el resto de los jugadores observamos variabilidad, serían necesarios datos adicionales sobre lesiones, molestias musculares, horas jugadas, intensidad de los entrenamientos y descansos para poder perfilar estos resultados.

Se observó un incremento de la síntesis de proteínas:

- A las 72h en el 44% de los jugadores: Centrocampista A, Portero, Delantero B, Delantero C
- A los 15D en el 44% de los jugadores: Defensa A, Centrocampista C, Delantero B, Delantero C
- A los 23D en el 56% de los jugadores: Centrocampista B, Portero, Centrocampista C, Delantero B, Delantero C.
- A los 34D en el 67% de los jugadores: Centrocampista B, Delantero A.

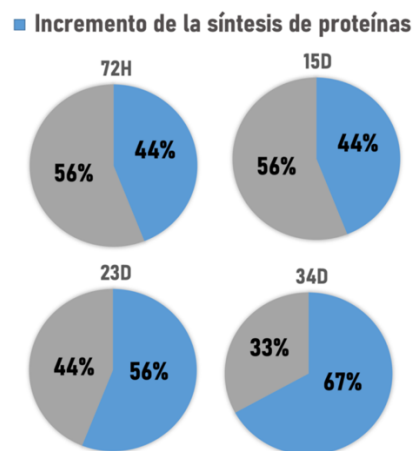


Figura 13: Aumenta la síntesis de proteínas a las 72h en un 44,44% de los casos estudiados; A los 15D en un 44,44% de los casos estudiados; A los 23D en un 55,56% de los casos estudiados; A los 34D en un 66,67% de los casos estudiados.

Evidencia Científica

- Informe Resumen resultados BIOW Villarreal Oct 2022.
- Publicación científica: Pendiente de publicación indexada

3.7.- Inflamación

Efectos Biow:

- Mantenimiento de los niveles de los factores de inflamación TNF-alfa e Interleucina 6

Método

Mediante técnica de ELISA se determinaron los niveles plasmáticos de factores de inflamación TNF-a y IL-6

Resultados/Comentario

El 42% de casos estudiados se encontraron niveles aumentados y mantenidos de TNF-a en el 57%. Tanto en las mujeres como en las personas mayores se encontraron niveles elevados en el 50% de casos.

En cuanto a los niveles de IL-6 en más del 80% de casos los niveles se mantuvieron con la exposición de Biow.

		TNF-a				
		Total	Hombres	Mujeres	Mayores	Menores
Significativamente	Sube	11/26=42,3%	4/12=33,3%	7/14=50%	5/10=50%	6/16=37,5%
	Baja	0/26=0%	0/12=0%	0/12=0%	0/10=0%	0/16=0%
	Se mantiene	15/26=57,7%	8/12=66,7%	7/14=50%	5/10=50%	10/16=62,5%
Tendencia	Sube	14/26=53,84%	6/12=50%	8/14=57,1%	5/10=50%	9/16=56,25%
	Baja	5/26=19,23%	4/12=33,3%	1/14=7,2%	2/10=20%	3/16=18,75%
	Se mantiene	7/26=26,92%	2/12=16,7%	5/14=35,7%	3/10=30%	4/16=25%

		IL-6				
		Total	Hombres	Mujeres	Mayores	Menores
Significativamente	Sube	2/26=7,7%	1/12=8,33%	1/14=7,1%	1/10=10%	1/16=6,25%
	Baja	2/26=7,7%	1/12=8,33%	1/14=7,1%	1/10=10%	1/16=6,25%
	Se mantiene	22/26=84,6%	10/12=83,33%	12/14=85,8%	8/10=80%	14/16=87,5%
Tendencia	Sube	8/26=30,8%	4/12=33,3%	4/14=28,6%	3/10=30%	5/16=31,25%
	Baja	10/26=38,4%	4/12=33,3%	6/14=42,8%	5/10=50%	5/16=31,25%
	Se mantiene	8/26=30,8%	4/12=33,3%	4/14=28,6%	2/10=20%	6/16=37,5%

Evidencia científica

- Proyecto científico:
"Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos" IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Informe resultados Inflamación Biow. Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Datos NO PUBLICADOS en revista indexada

3.8.- Oxigenación y vascularización

Efectos Biow:

- Optimiza la Ruta del Oxígeno para ayudar a la función respiratoria
- Incrementa la producción de factores activadores de la respuesta a la falta de oxígeno (HIF-1alfa) en los tejidos
- Dispara la reacción en cadena de moléculas VEGF y EPO que estimula la angiogénesis e incrementa el número de glóbulos rojos
- Facilita la recuperación del metabolismo y la supervivencia de las células que ven reducida la disponibilidad de oxígeno
- La respuesta rápida para prevenir problemas circulatorios.
- Mejora la respuesta hormonal para la formación de glóbulos rojos transportadores de oxígeno, sin alterar la viscosidad sanguínea.

Método

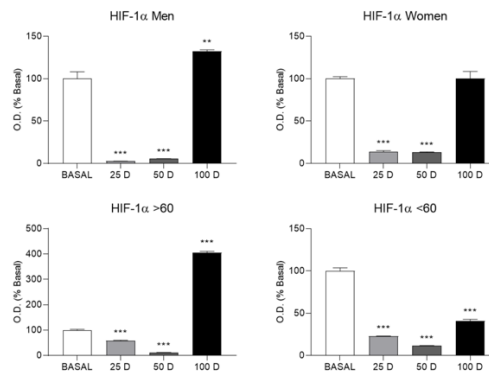
Detección de proteínas en suero/plasma mediante técnicas de ELISA

Resultados/Comentario

El sistema cardiovascular transporta continuamente oxígeno hasta las células. Las mitocondrias, presentes prácticamente en todas las células, utilizan el oxígeno junto con otros componentes para generar energía útil. El cuerpo intenta mantener los niveles de oxígeno de los tejidos en condiciones óptimas para la supervivencia de las células, y la demanda de oxígeno depende de las necesidades metabólicas de cada tejido. Ciertos trastornos relacionados con la respiración o la circulación pueden reducir los niveles de oxígeno en la sangre (hipoxemia), disminuyendo las reservas de oxígeno disponible en los tejidos (hipoxia) y terminar dañando funciones clave en nuestro organismo.

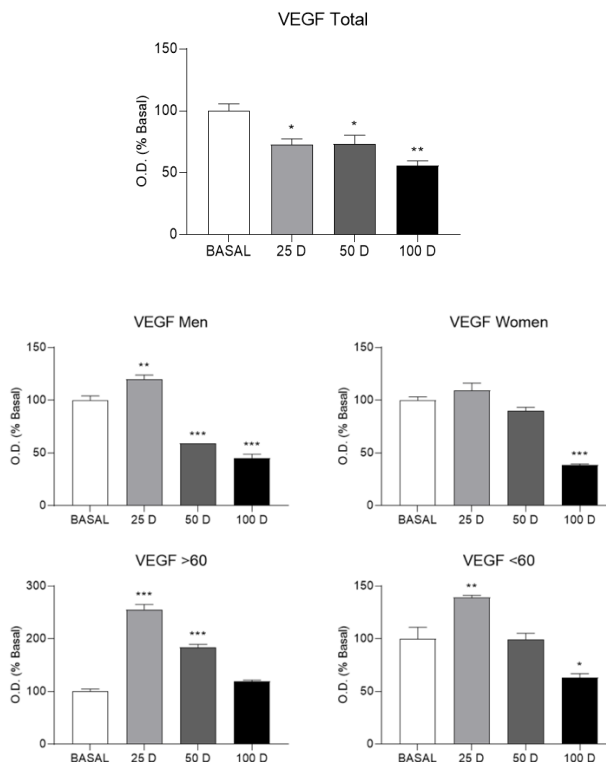
En respuesta a esta hipoxia de los tejidos se producen ciertas moléculas que activan sus proteínas dianas y permiten una respuesta adaptativa a la reducción de las reservas disponibles del oxígeno. Entre estas moléculas activadoras están los factores inducidos por hipoxia (HIF) que, tras activar la respuesta a la disminución de la disponibilidad de oxígeno en el entorno celular, influyen en el metabolismo y la supervivencia de las células, y la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis). Entre las proteínas dianas está el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la eritropoyetina (EPO).

La hipoxia induce la activación de la expresión génica de HIF-1, que se inactiva rápidamente en presencia de oxígeno. El estrés oxidativo desempeñaría un papel importante en las vías de regulación dependientes del HIF-1 tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas (Montserrat et al., 2004). Los resultados parecen indicar que en los primeros momentos se dispara el HIF-1 para facilitar la respuesta a la hipoxia y con el tiempo, incrementando la oxigenación ya no sería necesario. Los hombres y las mujeres tienen una respuesta rápida. Las personas mayores precisan un incremento más prolongado de HIF-1 que los jóvenes, lo que se correlaciona con el agravamiento del proceso con la edad.



Entre los productos proteicos identificados de los genes diana del HIF-1 para aumentar la biodisponibilidad de oxígeno figuran, entre otros, al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la eritropoyetina (EPO).

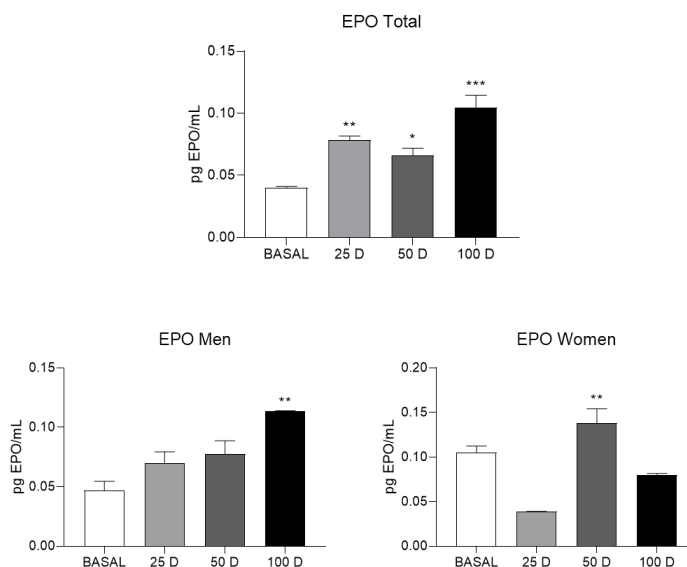
El VEGF y otras citocinas como el TNF- α intervienen en distintas etapas de la angiogenia, para incrementar la distribución de oxígeno celular y la glucólisis.



Los resultados mantienen la equivalencia con el HIF siguiendo el mismo patrón en hombres y mujeres con incremento en tiempos cortos y reducción a 100 días. Los resultados por edades, sin embargo, solo muestra diferencias en menores de 60 años, lo que indica que la capacidad angiogénica esta reducida en los ancianos, lo cual es esperable. En el uso continuado y prolongado de Biow, se observa un incremento rápido (25 días) de VEGF, tanto en hombres como en mujeres. Tras 100 días de uso de Biow estos valores se reducen, lo que significa que ya no existe la señal de hipoxia que los activó como consecuencia del efecto de reparación iniciado por estos factores. En personas mayores de 60 años este efecto tiene mayor

impacto por cuanto a partir de esta edad los niveles de respuesta pronta de VEGF son marcadamente más altos, para contrarrestar la mayor dificultad cubrir las necesidades para restaurar los tejidos más envejecidos y con menor capacidad angiogénica ante la falta de oxígeno. VEGF estimula la supervivencia de las células endoteliales, su proliferación y su motilidad, iniciando la gemación de nuevos capilares.

Para mantener la homeostasis del oxígeno en los mamíferos adultos, cuando el riñón detecta hipoxia, segrega un factor de crecimiento eritroide, la eritropoyetina (EPO), que estimula la eritropoyesis en la médula ósea. La producción de EPO inducible por hipoxia, está controlada a nivel de transcripción génica principalmente por la vía del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF). La EPO mantiene el patrón anterior con resultados distintos por sexos, pareciendo que las mujeres tienen un disparo de la producción de EPO ralentizada en comparación con los hombres. Aún no tenemos datos por distribución etaria.



Una respuesta fisiológica clásica a la hipoxia sistémica es el aumento de la producción de glóbulos rojos. Los factores inducibles por la hipoxia (HIF) orquestan esta respuesta induciendo cambios de expresión génica específicos del tipo de célula que dan lugar a un aumento de la producción de eritropoyetina (EPO) en el riñón y el hígado, a una mayor captación y utilización del hierro y a ajustes del microentorno de la médula ósea que facilitan la maduración y proliferación de los progenitores eritroides (Haase, 2013). Sin embargo, a nivel plasmático son las células sanguíneas las que producen el HIF-1 (y HIF-2 que aún no hemos estudiado pero que podría tener también alto interés) que inducirá también (además de riñón e hígado) la liberación de EPO a plasma. Nosotros en este trabajo hemos medido HIF-1 en eritrocitos, pero pensamos ampliar el estudio al conjunto de células mononucleares de sangre periférica para incrementar la información sobre el caso. No podemos olvidar que estas células no solo recogen información de todo el organismo, sino que ellas mismas pueden ser específicamente activadoras de mecanismos de respuesta a hipoxia, pero también a inflamación y/o toxicidad (Regueira et al., 2009).

Los datos obtenidos a nivel de las células nucleares de sangre periférica, por su capacidad de recoger información sistémica son habitualmente buenos marcadores de la situación general del individuo, si bien no son capaces de predecir ni detectar datos concretos de órganos específicos, cuyo interactoma debería ser estudiado de forma exclusiva.



Evidencia científica

- Proyecto científico:
“Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos” IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Informe BiowOSAHSAEPO_preliminar*. Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- *Publicación científica: Pendiente de publicación indexada*

3.9.- Función Linfocitaria

Efecto Biow:

- Mejora la salud inmunológica por su efecto restaurador y rejuvenecedor de la función mitocondrial de linfocitos.

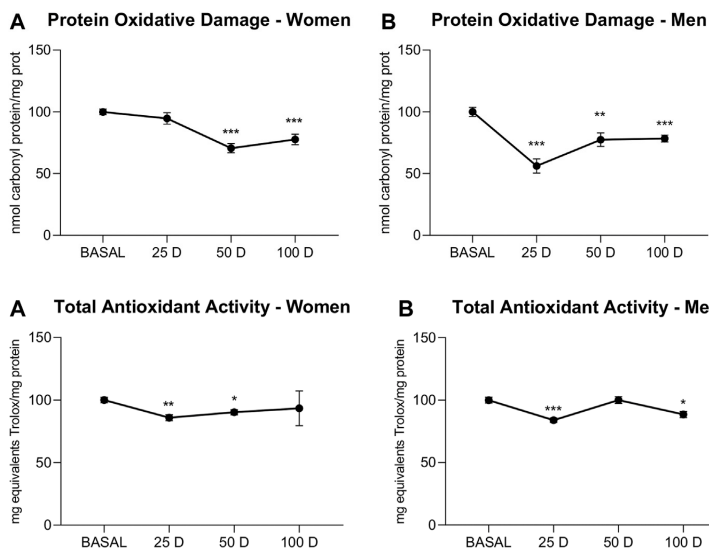
Método

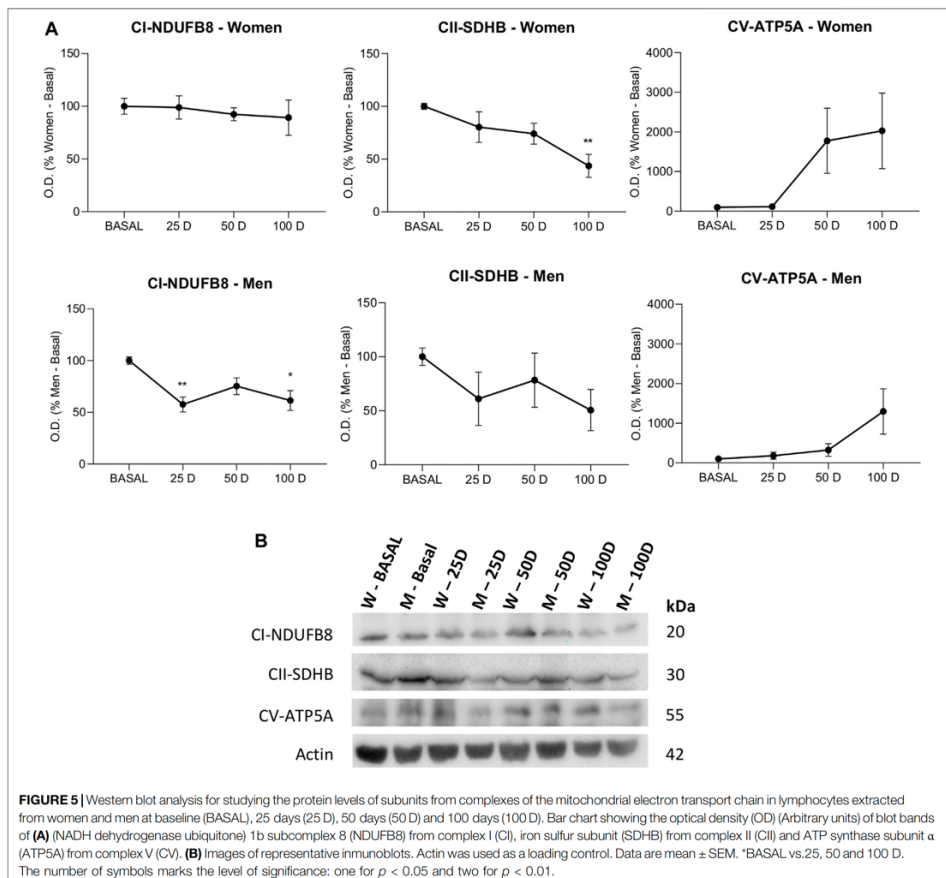
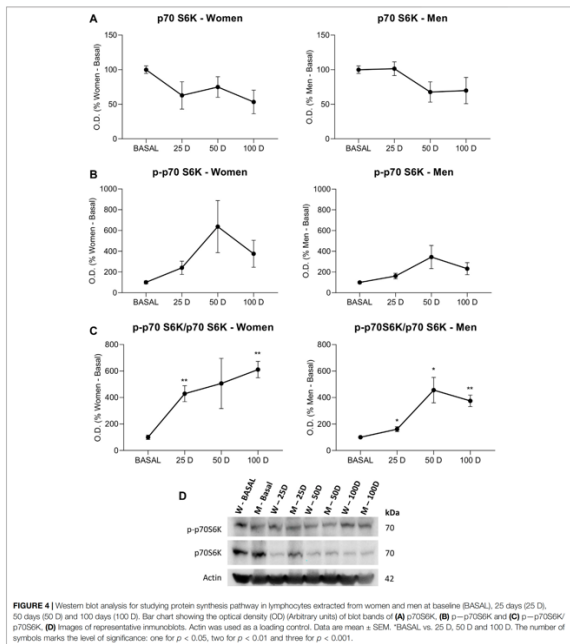
Los estudios del efecto biow se realizaron en células polimorfonucleares sanguíneas, concretamente linfocitos periféricos circulantes, aislados mediante centrifugación en gradiente de densidad a partir de sangre total

Resultados/Comentario

Los resultados moleculares obtenidos en linfocitos circulantes aislados de sangre total así como la detección de cambios en proteínas plasmáticas, demuestran que la trasmisión en flujo laminar directo de concentraciones bajas de aniones de O_2^- , facilita su absorción por la piel y mucosas y que dichos aniones alcanzan el torrente sanguíneo y se distribuyen por los tejidos, confirmando la biodisponibilidad celular de aniones O_2^- como componentes potencialmente activos para los procesos biológicos Redox.

La exposición a Biow induce un aumento de la síntesis de proteínas y de energía mitocondrial (ATP), y una disminución de la oxidación de proteínas y de la generación de radicales libres mitocondriales





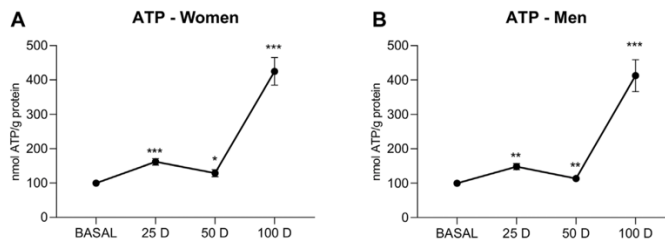


FIGURE 6 | ATP content (expressed as nmol ATP/g protein) of lymphocytes extracted from women **(A)** and men **(B)** at baseline (BASAL), 25 days (25 D), 50 days (50 D) and 100 days (100 D). Data are mean \pm SEM. *BASAL vs.25, 50 and 100 D. The number of symbols marks the level of significance: one for $p < 0.05$, two for $p < 0.01$ and three for $p < 0.001$.

Evidencia científica

- Proyecto científico:
“Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos” IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Informe Resultados 65 casos. A Coto.BIOWGlobal.pdf. Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Comunicación científica:
Cold atmospheric plasma-activated air modulates oxidative response to exposome, inducing tissue phenotype resilience. International Conference on Plasma Medicine (ICPM003 2021: 15. August 09-10, 2021 in New York, United States
- Publicación indexada
Antuña E, et al. Removal of Environmental Nanoparticles Increases Protein Synthesis and Energy Production in Healthy Humans. Front Bioeng Biotechnol. 2022 Feb 14; 10:800011. doi: 10.3389/fbioe.2022.800011. PMID: 35237574; PMCID: PMC8883322

3.10. Función Eritrocitaria

Efecto Biow

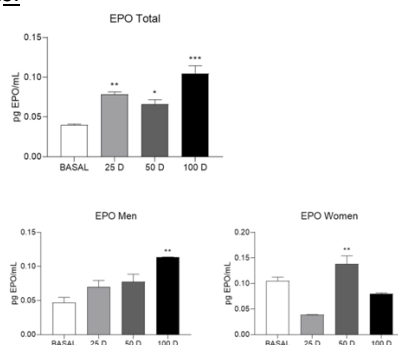
- Mejora la respuesta hormonal para la formación de glóbulos rojos transportadores de oxígeno, sin alterar la viscosidad sanguínea.

Método

Detección de proteínas en suero/plasma mediante técnicas de ELISA

Resultados/Comentario

El efecto de Biow, medido en eritrocitos, consistió en la activación de la hormona EPO en plasma, con una respuesta caracterizada globalmente por un incremento progresivo de los niveles de EPO, con el uso prolongado y continuado de Biow y con niveles del hematocrito normales e incluso mostrando discreto descenso sobre los valores basales.



La hormona eritropoyetina (EPO) mantiene constante la concentración de glóbulos rojos (eritrocitos), actuando en respuesta a la reducción de la concentración de oxígeno en la sangre, al recibir señales de varios factores entre ellos el factor HIF liberado por las células sanguíneas.

Ante la falta de oxígeno el organismo responde aumentando la producción de glóbulos rojos circulantes en la sangre. Esta respuesta inicialmente la dirigen los factores inducibles por la hipoxia (HIF) que activan la síntesis de la eritropoyetina (EPO) que se libera al plasma.

Los pacientes con anemia presentan una reducción de los glóbulos rojos y de la hemoglobina, que se traduce en un descenso de la capacidad de transportar oxígeno. En los últimos años, el uso de EPO se ha extendido a anemias sintomáticas asociadas a patologías no renales como cáncer, HIV, pacientes prequirúrgicos, donantes autólogos de sangre y trasplante de médula alogénico.

Evidencia científica

- Proyecto científico:
“Validación de las aplicaciones de la unidad de nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) (Biow) en la reducción del estrés oxidativo y mejora celular a nivel sistémico en adultos” IP: Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Informe Resultados 65 casos. A Coto.BIOWGlobal.pdf. Dra. AM Coto Montes. Grupo cROS. Facultad de Medicina de la Universidad de Oviedo, Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias.
- Publicación científica: Pendiente de publicación indexada

3.11. Inmunosenescencia

Efecto Biow:

- Tendencia a la disminución de linfocitos senescentes circulantes, previniendo el letargo prematuro de las células y contrarrestando la inflamación sostenida y/o acelerada

Método

1. Telomere Length Assay mediante tecnología Telomere Analysis Technology® (TAT®): metodología High-throughput Q-FISH validada para medir la longitud telomérica en suspensiones celulares y tejidos, *cromosoma a cromosoma, con un coeficiente de variación < 5%*:
 - Media y mediana de la longitud telomérica por muestra poblacional (en kpb)
 - % de telómeros cortos
 - Percentil 20
 - Histograma completo de la distribución teloméricaTelomere Associated variables (TAVs). Análisis extensivo de más de 200 variables asociadas a la longitud telomérica y permite identificar diferencias en la distribución que podrían pasar desapercibidas en el análisis estándar. Se analizan múltiples percentiles de longitud telomérica, % de telómeros con una longitud telomérica determinada y % de células con una longitud telomérica determinada.
2. Telomerase Activity Assay mediante Q-TRAP: técnica optimizada para medir la actividad telomerasa en cualquier tipo de muestra biológica.

Resultados/Comentario

Las células senescentes son células aletargadas, envejecidas, sin capacidad para dividirse, que no se mueren. Estas células permanecen activas, con un metabolismo alterado y produciendo sustancias dañinas, mediadoras de la inflamación crónica en los tejidos y órganos de nuestro organismo. Cuando estas células senescentes se acumulan en el tiempo, dificultan la regeneración de los tejidos y aumentan el riesgo de enfermedades, acelerando el envejecimiento. La exposición a Biow ha demostrado reducir el número de células senescentes.

En el análisis comparativo de más de 10.000 telómeros en linfocitos circulantes, antes y después de 100 días de uso continuado del sistema Biow, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras no solo en las variables estándar (longitud media de los telómeros, percentil 20th de longitud telomérica, y porcentaje de los telómeros <3kbp), sino que también en las variables asociadas (TAVs). Especialmente se detectó una disminución de la variable que clasifica el tipo de célula (ShortCell) según el tamaño de los telómeros. Estos resultados indican que existe una tendencia a la disminución de linfocitos senescentes circulantes, previniendo el letargo prematuro de las células y contrarrestando la inflamación sostenida y/o acelerada.

“B versus 100” Comparative analysis

Quality Control results

- The standard regression curve’s coefficient of determination R^2 for the plates analyzed met our quality control standards ($R^2 > 0.92$).
- More than 10,000 telomeres were analyzed for all samples.

TAT results and statistical analysis

- Various differences were detected between the samples not only in the standard variables (Median telomere length, 20th percentile length and % of telomeres < 3 Kbp) but also in the extended telomere associated variables included in the excel file provided with this report.
- The statistical analysis for the standard variables, detected various significant differences as it can be seen in the complementary excel file.

TAV Analysis

- The complete TAV analysis can be found in the excel file provided with this report.
- In order to identify potential changes in the cellular profile of the participants, before and after the treatment, an analysis was performed using the ShortCell variables. From the initial three basal (pre-treatment) measurements the average (AVG) ShortCell values were calculated and then were used to compare with the ShortCell values at time point 100 days and after the treatment was applied. If we compare per couple, we obtain the following results:

Telomere length results from TAT analysis

The following table shows the median telomere length (MTL) and 20th percentile telomere length (both in base pairs - bp) for each sample as well as the percentage of short telomeres. The latter is defined as the percentage of the telomeres with a length below 3 Kbp (<3 Kbp). All measurements were performed in quintuplicate.

TAT ANALYSIS

Client ID	Partija	Sexo	Edad	Tiempo	Median Telomere Length (bp)	20 th Percentile Length (bp)	Telomeres < 3 Kbp (%)	CV (%)
T01	1	Femenino	59	1	10103	7541	2.07	2.61
T02	1	Masculino	62	1	10605	7090	2.57	3.97
T03	2	Masculino	59	1	10661	8177	2.90	1.94
T04	2	Femenino	49	1	12008	8255	1.17	1.15
T05	3	Femenino	62	1	10805	7386	2.79	0.91
T06	3	Masculino	63	1	10516	8949	1.45	1.25
T07	4	Femenino	64	1	10345	8787	3.16	2.14
T08	4	Masculino	66	1	11227	7661	1.19	1.19
T09	5	Masculino	69	1	10621	8243	4.89	1.55
T10	5	Femenino	61	1	10482	8905	3.31	3.98
T11	6	Femenino	59	1	10915	7469	2.96	2.66
T12	6	Masculino	59	1	11317	8268	1.44	1.37
T01	1	Femenino	59	7	11075	7793	1.26	0.88
T02	1	Masculino	62	7	11079	9478	2.08	2.1
T03	2	Masculino	59	7	10919	8391	4.06	2.25
T04	2	Femenino	49	7	11861	8462	1.31	0.88
T05	3	Femenino	62	7	10587	8796	3.83	2.25
T06	3	Masculino	63	7	11044	8721	1.58	1.81
T07	4	Femenino	64	7	10587	8025	2.83	4.31
T08	4	Masculino	66	7	11890	8540	1.29	0.38
T09	5	Masculino	69	7	11876	7844	2.88	1.18
T10	5	Femenino	61	7	10911	7840	2.19	1.05
T11	6	Femenino	59	7	11196	7670	1.19	2.12
T12	6	Masculino	59	7	11984	8190	1.19	0.1
T01	1	Femenino	59	14	11471	7978	1.62	0.81
T02	1	Masculino	62	14	11304	7742	1.77	3.75
T03	2	Masculino	59	14	10323	8809	3.07	1.77
T04	2	Femenino	49	14	11039	8727	1.89	1.01
T05	3	Femenino	62	14	10893	7402	2.41	0.82
T06	3	Masculino	63	14	10724	7955	3.03	0.79
T07	4	Femenino	64	14	10465	7697	2.89	1.09
T08	4	Masculino	66	14	11396	7844	1.85	2.23
T09	5	Masculino	69	14	11061	8480	1.57	1.28
T10	5	Femenino	61	14	10894	7400	2.45	1.48
T01	1	Femenino	59	100	10926.4	7079.2	1.2	1.3
T02	1	Masculino	62	100	10168	8106.2	4.11	1.75
T03	2	Masculino	59	100	9908	8261.2	4.18	0.76
T04	2	Femenino	49	100	11414.8	8005.2	1.19	1.21
T05	3	Femenino	62	100	10472.8	6881.8	3.88	0.74
T06	3	Masculino	63	100	10185.2	8263.2	1.45	1.71
T07	4	Femenino	64	100	10984.8	8336.8	1.54	0.55
T08	4	Masculino	66	100	11882	7329.33	2.21	0.11
T09	5	Masculino	69	100	10748	7661.4	1.71	3.85
T10	5	Femenino	61	100	1078.2	8236	1.62	1.81
T11	6	Femenino	59	100	10522.2	6488.8	1.67	2.1
T12	6	Masculino	59	100	11433.2	7906.4	2.48	1.4

“B versus 100” Comparative analysis

Q-TRAP ANALYSIS

Client ID	Partija	Sexo	Edad	Tiempo (días)	RTA (%)	SD (%)
T01	1	Femenino	59	1	28.08	3.98
T02	1	Masculino	62	1	21.04	4.29
T03	2	Masculino	59	1	25.08	4.29
T04	2	Femenino	49	1	18.04	41.09
T05	3	Femenino	62	1	9.54	2.64
T06	3	Masculino	63	1	16.53	5.15
T07	4	Femenino	64	1	103.33	11.28
T08	4	Masculino	66	1	22.59	5.69
T09	5	Masculino	69	1	29.33	1.81
T10	5	Femenino	61	1	25.14	10.11
T11	6	Femenino	59	1	80.93	4.35
T12	6	Masculino	59	1	28.67	8.2
T01	1	Femenino	59	7	20	0.59
T02	1	Masculino	62	7	13.56	1.64
T03	2	Masculino	59	7	26.38	3.96
T04	2	Femenino	49	7	26.44	11
T05	3	Femenino	62	7	26.88	4.28
T06	3	Masculino	63	7	43.85	16.43
T07	4	Femenino	64	7	29.88	10.91
T08	4	Masculino	66	7	8.25	1.04
T09	5	Masculino	69	7	44.87	11.09
T10	5	Femenino	61	7	13.73	3.43
T11	6	Femenino	59	7	24.84	6.98
T12	6	Masculino	59	7	17.93	0.4
T01	1	Femenino	59	14	21.64	5.83
T02	1	Masculino	62	14	23.25	2.44
T03	2	Masculino	59	14	33.64	4.97
T04	2	Femenino	49	14	21.19	1.31
T05	3	Femenino	62	14	14.55	1.25
T06	3	Masculino	63	14	17.73	4.79
T07	4	Femenino	64	14	23.88	5.65
T08	4	Masculino	66	14	19.81	1.44
T09	5	Masculino	69	14	60.11	1.28
T10	5	Femenino	61	14	28.39	6.94
T01	1	Femenino	59	100	9.11	0.72
T02	1	Masculino	62	100	2.48	0.66
T03	2	Masculino	59	100	13.47	3.35
T04	2	Femenino	49	100	3.19	0.11
T05	3	Femenino	62	100	4.31	0.77
T06	3	Masculino	63	100	18.03	1.81
T07	4	Femenino	64	100	20.08	4.64
T08	4	Masculino	66	100	4.05	0.88
T09	5	Masculino	69	100	17.04	2.86
T10	5	Femenino	61	100	11.7	0.87
T11	6	Femenino	59	100	3.88	0.33
T12	6	Masculino	59	100	18.09	3.11

Extended Telomere Associated Variables (TAVs) analysis.

Telomere Length Percentiles

Percentile is the point in a distribution at which a given percentage of determined values or scores is found. The telomere length percentiles comprise of one hundred individual telomere length measurements per sample including the length of the shortest telomeres in the sample (1st percentile length) and the length of the longest telomeres (100th percentile length). The percentiles allow for a comprehensive comparison between all the telomere lengths present in each sample throughout the telomere length distribution.

Percentages of telomeric length values - ShortTel

The ShortTel variables are the percentages (%) of telomeres with a specific telomere length (in 500 bp intervals). For example, ShortTel 1000 indicates the percentage of telomeres that have a length between 500-1000 bp.

The ShortTel variables help identify whether one sample has a higher percentage (quantity) of shorter or longer telomeres as well as detect differences between samples in a specific area of the distribution.

Percentages of cells with specific telomere values - ShortCell

The ShortCell variables are the percentages of cells with a specific average telomere length (in 500 bp intervals). With the ShortCell variables it can be detected whether a sample presents a higher percentage of cells with shorter telomeres or longer ones. For example, ShortCell 1000 is the percentage of cells that have an average telomere length between 500- 1000 bp.

“B versus 100” Comparative analysis

Figure 1. No particular differences were identified in the telomeric cellular profiles.

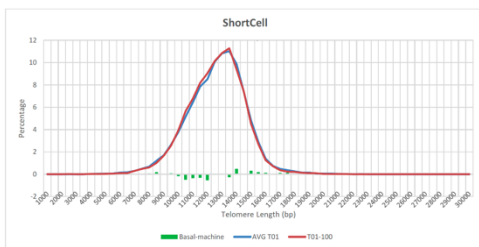
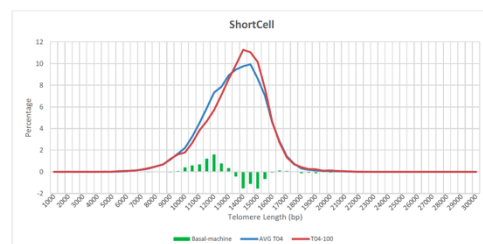
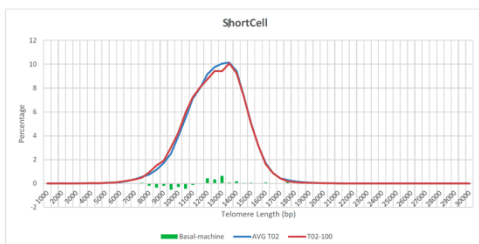
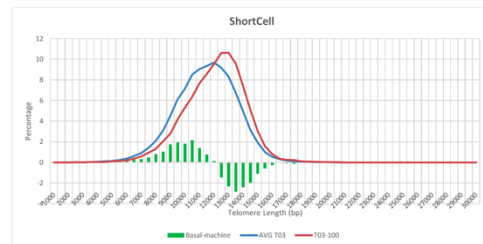
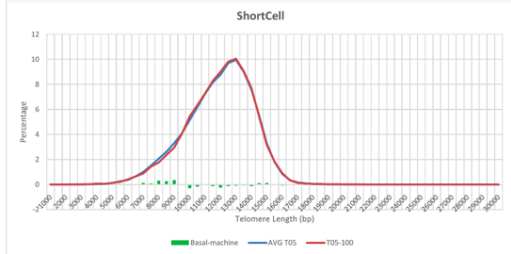


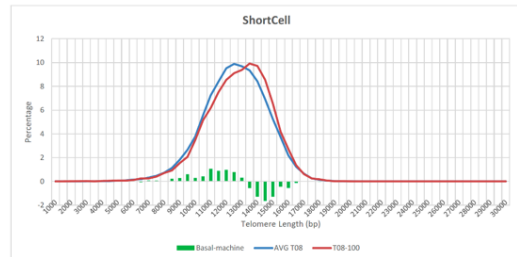
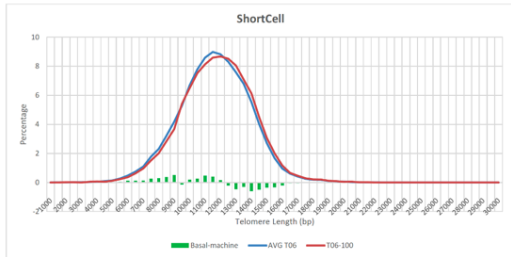
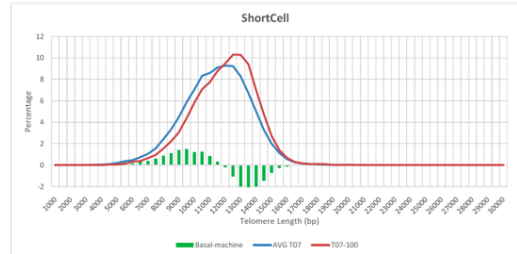
Figure 2. Both participants showed an improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (100 day graph shifts to the right compared to the AVG baseline).



Couple 3. No particular differences were identified in these telomeric cellular profile of participant 05. Participant 6 showed a slightly improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (100 day graph shifts to the right compared to the AVG baseline).

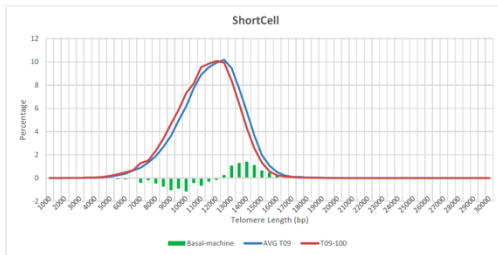


Couple 4. Both participants showed an improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (red graph shifts to the right compared to the blue one).

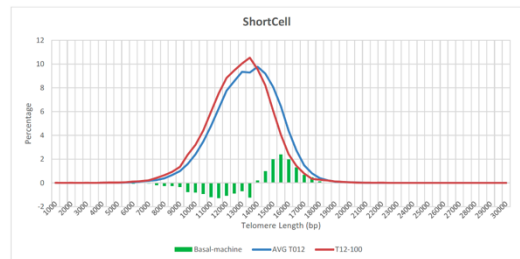
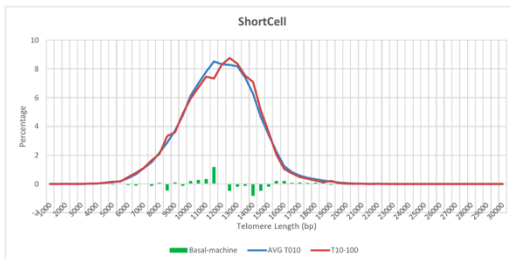
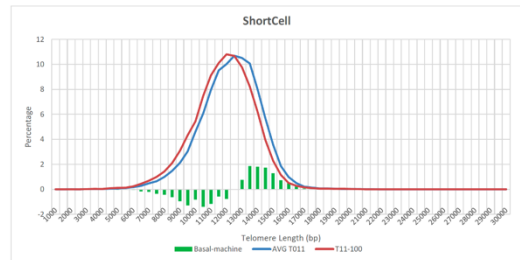


“B versus 100” Comparative analysis

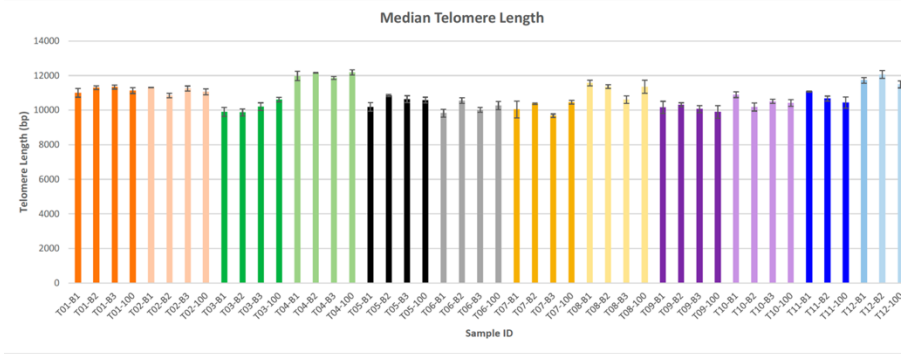
Couple 5. For participant 09 the telomeric profile at baseline was found to be better than the profile identified after 100 days. For participant 10 there are small differences only in certain areas of the distribution. These differences suggest a very small improvement after the treatment.



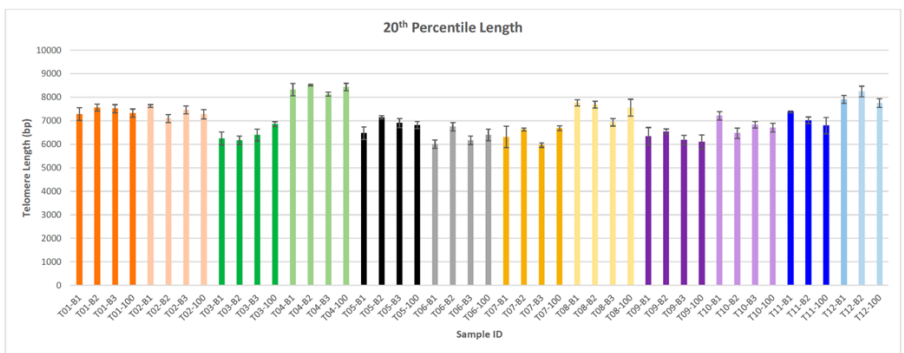
Couple 6. For both of these participants the telomeric profiles at baseline were found to be better than the profiles identified after 100 days.



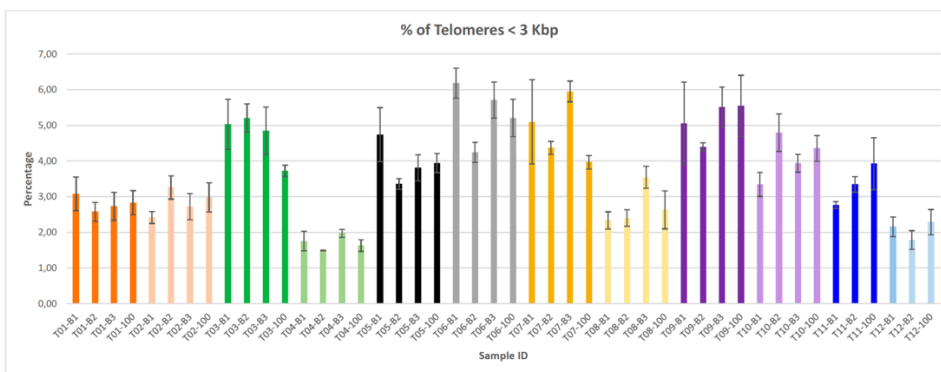
Figures 1-3. Bar charts of TAT results (Median Telomere Length, 20th Percentile Telomere Length and % Short Telomeres) for all samples.



“B versus 100” Comparative analysis



“B versus 100” Comparative analysis



“B versus 100” Comparative analysis

Figure 4. Comparison of Percentile curves for samples

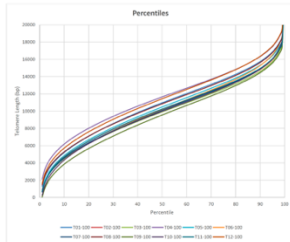
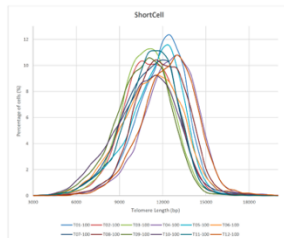
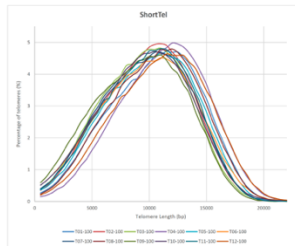


Figure 6. Comparison of ShortTel values for samples



“B versus 100” Comparative analysis

Figure 5. Comparison of ShortTel values for samples



Quality Control results

- The standard regression curve's coefficient of determination R^2 for the plates analyzed met our quality control standards ($R^2 > 0.92$).
- More than 10000 telomeres were analyzed for all samples.

TAT y TAVs results and statistical analysis

- Various biological differences were detected between the samples not only in general variables as (MTL, 20th percentile and short telomere <3Kpb) (Fig 3) but the other all telomere variables determined (Fig 4, 5 and 6).
- Samples T04-100 and T12-100 present the highest telomere lengths in all the percentiles, being sample T04-100 the one that has fewer short telomeres since their length is longer in the lowest percentiles. This is also mirrored in the ShortTel category, where the lowest percentages of short telomeres were found.
- Samples T04-100 and T12-100 present the highest percentages of cells with long telomeres and the lowest percentages of cells showing short telomeres.

COD	INITIALS	SEX	DoB	AGE	RESULTS / SHORTCELL	Associated diseases
T01	NGDLC	F	27/12/61	60	No particular differences were identified in the telomeric cellular profiles.	= Diabetes Mellitus II (2016). Familiar Hyperlipemia. Merckel Diverticulus
T02	FJAS	M	31/8/59	62	No particular differences were identified in the telomeric cellular profiles.	= Atrophic kidney.
T03	JLOR	M	3/1/62	59	Improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (100 day graph shifts to the right compared to the AVG baseline).	I HTA. Arthritis
T04	RSG	F	19/12/71	50	Improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (100 day graph shifts to the right compared to the AVG baseline).	I Peritonitis. Tifus.
T05	ARRD	F	8/9/59	62	No particular differences were identified in these telomeric cellular profile	= TBC (1984). Helicobacter Piloni. Esophagic Ulcus.
T06	JCAP	M	24/9/58	63	Slightly improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (100 day graph shifts to the right compared to the AVG baseline).	Is No data yet
T07	MCSM	F	14/7/57	64	Improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (red graph shifts to the right compared to the blue one).	I COVID 19 March 2022. Hypercolesterolemia. Arthrosis. Apendicectomy. Mamary Ductus
T08	JAFB	M	5/12/55	66	Improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (red graph shifts to the right compared to the blue one).	I No data yet
T09	SLM	M	8/2/52	69	Telomeric profile at baseline was found to be better than the profile identified after 100 days.	D Covid19(2020). Prostatic Ca.
T10	MJIB	F	11/1/60	61	There are small differences only in certain areas of the distribution. These differences suggest a very small improvement after the treatment.	Is Covid19 (2020). Mild Ashma leve. Elbow fracture Adenoma hipofisis. Breast Ca (2012)
T11	GNR	F	2/5/62	59	Telomeric profiles at baseline were found to be better than the profiles identified after 100 days.	D Hipotiroidism (2019). Tto eutirox 1 cmp/dia
T12	DMTG	M	18/9/62	59	Telomeric profiles at baseline were found to be better than the profiles identified after 100 days.	D Melanoma "In situ" HTA. Hypercolesterolemia

Evidencia científica

- Proyecto científico: Wisdom
- Informe biow_TAT_study_Report. D2021_Sep29_LL.pdf.
- Informe biow_TAT_study_Report. D2021_Dec17_LL.pdf.
- Informe Biow_Statistical_Analysis_&_TAV_Analysis 2021 Sep29_LL.xlsx
- Informe Biow_Statistical_Analysis_&_TAV_Analysis 2021_Dec17_LL.xlsx
- Informe Biow_QTRAP_Study_Report2021_Sept29_LL.pdf
- Informe Biow_QTRAP_Study_Report2021_Dec17_LL.pdf
- Informe Biow_TAT_Study_Report. 2022_Mar17_LL.pdf
- Biow TAT & Q-TRAP data basal y 100.xlsx
- Publicación científica: Pendiente de publicación indexada

4.- Documentos justificativos de evidencia científica de los efectos derivados de la exposición al sistema Biow

Los resultados de investigación se recogen en memorias, informes técnicos, comunicaciones y publicaciones científicas. Si bien la actividad de investigación biomédica con humanos es reciente, iniciándose el reclutamiento de casos en junio del 2020 por lo que determinados resultados están pendientes de ser publicados, pero si están detallados en las memorias e informes técnicos.

Listado de documentación adjunta

- *Proyecto científico*
- *Informe Resultados 65 casos*
- *Comunicación científica*
- *Publicación indexada*
- *Informe sobre emisión de aniones biodisponibles Biow60 e individual Biowspace iones.pdf. Analiza Calidad*
- *Informe sobre emisión de aniones biodisponibles Biow60 iones.pdf Analiza Calidad*
- *Informe sobre emisión de aniones biodisponibles Biow100 iones.pdf Analiza Calidad*
- *Informe BiowOSAHSAEPO_preliminar*
- *Informe Resumen resultados BLOW Villarreal Oct 2022.*
- *Informe biow_TAT_study_Report. D2021_Sep29_LL.pdf*
- *Informe biow_TAT_study_Report. D2021_Dec17_LL.pdf*
- *Informe Biow_Statistical_Analysis_&_TAV_Analysis 2021 Sep29_LL.xlsx*
- *Informe Biow_Statistical_Analysis_&_TAV_Analysis 2021_Dec17_LL.xlsx*
- *Informe Biow_QTRAP_Study_Report2021_Sept29_LL pdf*
- *Informe Biow_QTRAP_Study_Report2021_Dec17_LL_pdf*
- *Informe Biow_TAT_Study_Report. 2022_Mar17_LL pdf*
- *Informe Biow TAT & Q-TRAP data basal y 100.xlsx*



Dra. Ana Coto-Montes
Dr. Juan Jose Solano Jaurrieta

Grupo de Respuesta Celular al Estrés Oxidativo
Departamento de Morfología y Biología Celular
Facultad de Medicina
Universidad de Oviedo
Asturias. España. (Spain)
acoto@uniovi.es
Phone: 34-985-3102779/5231
Fax: 34-985-103618



VALIDACION DE LAS APLICACIONES DE LA UNIDAD DE NANOFILTRADO DE AMPLIO ESPECTRO (UNAE24/365) (BioW[®]) EN LA REDUCCION DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y MEJORA CELULAR A NIVEL SISTEMICO EN ADULTOS

IP: Ana Coto-Montes

Proyecto desarrollado en el grupo consolidado cROS dentro del Instituto de Investigación Biosanitaria del Principado de Asturias

La IP de dicho proyecto se compromete a desarrollarlo en los términos que se especifican a continuación

**COTO
MONTES
ANA MARIA
10867988M**

Digitally signed by COTO
MONTES ANA MARIA -
10867988M
DN: c=ES,
serialNumber=IDCES-10867
988M, givenName=ANA
- MARIA, sn=COTO MONTES,
cn=COTO MONTES ANA
MARIA - 10867988M
Date: 2020.03.03 12:34:22
+01'00'

INFORMACIÓN AL USUARIO

Estimado Sr. o Sra.:

Se le ha solicitado colaborar en nuestro trabajo de investigación en el que se le solicita que utilice la Unidad de Nanofiltrado de amplio espectro (UNAE24/365) durante al menos 50 días y se le informa que se le extraerá una muestra de sangre al principio del estudio y al cabo de 25 y 50 días. El estudio podría ampliarse lo que implicaría a su vez, un incremento del periodo de utilización del equipo sin coste por parte del participante en el estudio y la extracción en intervalos de 25 días de muestras de sangre para su estudio. La utilización del equipo no implicará ningún tipo de coste por parte del participante en el estudio.

Para usted supone la extracción, de un volumen de sangre de 8ml del que se extraería parte para llevar a cabo un hemograma básico y un estudio de caracterización oxidativa e inflamatoria. Toda esta información se le aportará en cada uno de los ensayos, para que conozca los resultados de la aplicación del sistema de filtrado en su organismo.

Usted podría a lo largo de todo el estudio rechazar o no aceptar las mediciones, lo que implicaría que abandona el estudio. Ahora y en cumplimiento de la Ley 41/2002 de 14 de Noviembre “Básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica” y de la Ley 14/2007 de 3 de Julio “Ley Reguladora de Investigación Biomédica” reiteramos por escrito la explicación dada verbalmente, con objeto de que nos autorice a incluirlo en el mismo. Es importante que usted conozca y entienda la finalidad y los procedimientos llevados a cabo en este estudio, lea atentamente esta información y no dude en preguntar todas aquellas cuestiones que no le queden claras.

ANTECEDENTES DEL TEMA

Estudio del efecto de la Unidad de Nanofiltrado de Amplio Espectro (UNAE24/365) (BioW[®]) a nivel sistémico en adultos



La proporción de nanopartículas con las que convivimos, extendidas en el aire o contenidas en atomizadores, influye significativamente en nuestro estado de salud, ya que pueden entrar en nuestro organismo a través de las vías respiratorias y alcanzar la corriente sanguínea. Gracias a ella pueden ser diseminadas sistémicamente, dando lugar a efectos aún no del todo desentrañados, pero en muchos casos perjudiciales al poder funcionar como cofactores o agravantes de situaciones indeseables de muy diversa índole.

La unidad de Nanofiltrado de Amplio Espectro (UNAE24/365), desarrollada por BioW[®], retira las nanopartículas ambientales con alta efectividad gracias a un sistema de filtrado múltiple antibacteriano, fotocatalítico, electroestimulador y de carbón activado.

La retirada de dichas nanopartículas ambientales, debería reducir significativamente los efectos anteriormente citados siguiendo una curva dosis-respuesta y directamente relacionado con el estado basal del individuo. Para poder conocer realmente el alcance de esta mejora del individuo es necesario llevar a cabo estudios a nivel sistémico. Para ello necesitamos de su colaboración.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El proyecto de investigación financiado por la empresa BiowairTotal Systems S.L. y desarrollado por el grupo de investigación cROS perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias tiene por objeto el estudio de los efectos beneficios que el filtrado de las nanopartículas ambientales tiene para la salud de individuo y más específicamente en lo que respecta a la reducción en la producción de radicales libres en respuesta a dichas nanopartículas, lo que motivaría una reducción del estrés oxidativo y, con ello de la inflamación y alteración de los mecanismos celulares habitualmente provocado en el organismo por la absorción de dichas partículas ambientales.

DESCRIPCION DEL ESTUDIO

Los participantes en el estudio serán recibidos en Atención Primaria y se les extraerá una muestra de sangre antes de la colocación del equipo de filtrado y durante la utilización del mismo cada 25 días. La sangre se dividirá proporcionalmente para llevar a cabo un hemograma y para su empleo en investigación. La sangre dedicada a investigación será dividida en plasma, eritrocitos y células polimorfonucleares. En cada una de estas fases se harán estudios de valoración enzimática y de alteraciones en Biología Celular y Molecular conducentes a determinar las alteraciones que pueda existir en el individuo antes y después de utilizar el equipamiento. Podría suceder que además de las mediciones citadas se pudiese llevar a cabo una suspensión de células individuales para estudiar su evolución cultivo. Los resultados serán colgados de forma anónima en bases de datos científicas de carácter público.

Este estudio de investigación ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación (CEI/CEIm) del Principado de Asturias.

RIESGOS DEL ESTUDIO

No existen riesgos en el estudio que puedan resultar perjudiciales para su salud, aparte de los propios devenidos de la extracción de sangre.

BENEFICIOS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO

Además de la utilización del equipamiento durante la realización del estudio se les informará puntualmente de su estado oxidativo e inflamatorio resultado de las mediciones y de su evolución a lo largo del estudio. Estas determinaciones son realizadas de forma habitual en distintas clínicas y tienen un coste aproximado de 400€. Además, los datos recogidos en el estudio podrán derivar en un mayor conocimiento para la comunidad científica acerca del efecto habitual de las nanopartículas y la modificación que, a nivel sistémico, provoca la filtración de las mismas, lo que podría conllevar una determinación real de las alteraciones que la contaminación ambiental, el cambio climático y múltiples productos de uso cotidiano

en el hogar tiene sobre la salud de los individuos y como este sistema de filtración de nanopartículas podría reducir su efecto en el individuo.

OBLIGACIONES Y COSTOS

Su participación en el estudio es completamente voluntaria, usted puede negarse a participar. Así mismo podrá retirarse del estudio en cualquier momento sin que de ello se derive ningún perjuicio ni pérdida de los beneficios sanitarios a los que Usted tiene derecho. Su participación es gratuita.

Para aquellos voluntarios que hayan participado en el proyecto y que así lo deseen, se les podrá ceder el equipamiento con una reducción del 80% del precio del mismo.

CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Siguiendo el REGLAMENTO (UE) 2016/679 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos y por el que se deroga la Directiva 95/46/CE (Reglamento general de protección de datos), todos los datos recogidos en el transcurso del estudio serán tratados de forma estrictamente confidencial y anónima. Asimismo, serán utilizados únicamente para la valoración del estudio sin desvelar en ningún momento los datos de su identificación. Todas las personas que forman parte del equipo investigador están obligadas a mantener el secreto profesional.

Todas las muestras extraídas quedarán bajo la custodia del Instituto de Investigación Sanitaria y específicamente del investigador responsable del estudio, la Dra. Ana Coto-Montes, bien de forma personal, o en los laboratorios y servicios que ella considere oportuno y conveniente, durante el tiempo de duración necesario para llevar a cabo el proyecto de investigación que realiza. Se garantizará la trazabilidad de las muestras, células y cualquier material biológico de ustedes, para asegurar las normas de calidad y seguridad respetando el deber de confidencialidad y lo dispuesto en la Ley Orgánica

*Estudio del efecto de la Unidad de Nanofiltrado de Amplio Espectro
(UNAE24/365) (BioW[®]) a nivel sistémico en adultos*



3/2018, de 5 de Diciembre, de Protección de datos Personales y garantía de los derechos digitales (BOE-A-2018-16673).

Sus muestras serán codificadas y se trabajará con ellas de forma que se mantenga el anonimato en todo momento.

Agradecemos su colaboración, acepte o no su inclusión en este estudio.

En caso de aceptar, le rogamos que firme la hoja de consentimiento adjunta. Por supuesto, tenga la más absoluta garantía de que sus datos serán tratados de forma absolutamente confidencial, conforme a la legislación vigente.

Hoja de consentimiento informado

Título del Estudio: **VALIDACION DE LAS APLICACIONES DE LA UNIDAD DE NANOFILTRADO DE AMPLIO ESPECTRO (UNAE24/365) (BioW[®]) EN LA REDUCCION DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y MEJORA CELULAR A NIVEL SISTEMICO EN ADULTOS**

Yo.....(nombre y apellidos)

He recibido información sobre el citado estudio y he podido hacer preguntas sobre el mismo, de tal manera que juzgo que he recibido suficiente información sobre el mismo.

He hablado con.....(nombre del investigador)

Entiendo que queda absolutamente garantizada la privacidad de la información obtenida en este estudio.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Firma del participante o tutor legal

Firma del investigador

Fecha: __/__/__

Fecha: __/__/__

Compromiso de confidencialidad

Título del Estudio:

VALIDACION DE LAS APLICACIONES DE LA UNIDAD DE NANOFILTRADO DE AMPLIO ESPECTRO (UNAE24/365) (BioW[®]) EN LA REDUCCION DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y MEJORA CELULAR A NIVEL SISTEMICO EN ADULTOS

1. Se garantizará la protección de la intimidad personal y el tratamiento confidencial de los datos personales que resulten del estudio propuesto, conforme a lo dispuesto en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (BOE-A-2018-16673). Las mismas garantías serán de aplicación a las muestras biológicas que sean fuente de información de carácter personal.
2. La cesión de datos de carácter personal a terceros ajenos a la actuación médico-asistencial o al estudio propuesto, requerirá el consentimiento expreso y escrito del interesado. En el supuesto de que los datos obtenidos del sujeto fuente pudieran revelar información de carácter personal de sus familiares, la cesión a terceros requerirá el consentimiento expreso y escrito de todos los interesados.
3. Se prohíbe la utilización de datos relativos a la salud de las personas con fines distintos a aquellos para los que se prestó el consentimiento.
4. Quedará sometida al deber de secreto cualquier persona que, en el ejercicio de sus funciones en relación con una actuación médico-asistencial o al estudio propuesto, cualquiera que sea el alcance que tengan una y otro, acceda a datos de carácter personal. Este deber persistirá aún una vez haya cesado la investigación o la actuación.
5. Si no fuera posible publicar los resultados de esta investigación sin identificar a la persona que participó en la misma o que aportó muestras biológicas, tales resultados sólo podrán ser publicados cuando haya mediado el consentimiento previo y expreso de aquélla.

Firma del investigador responsable

Fecha

__/__/__

INFORME GLOBAL RESULTADOS BIOW GIJÓN 2020, GIJÓN 2021 Y VIGO 2021

Número de participantes: 65

Hombres: 34 Mujeres: 31

DAÑO DE PROTEÍNAS

Los resultados mostraron que el daño de proteínas en hombres disminuye a significativamente a los 25 días, sufriendo un ligero aumento a los 50 y 100 días, pero sin llegar a niveles basales. En cambio, el daño de proteínas en mujeres solamente disminuye ligeramente a los 50 días (figura 1).

Llama la atención la variabilidad en mujeres a los 100 días.

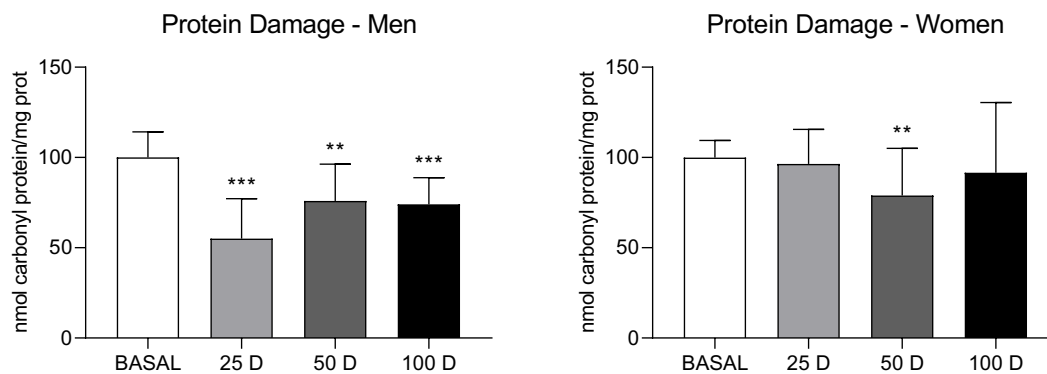


Figura 1. Daño de proteínas en hombres y mujeres.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Los resultados mostraron que la actividad antioxidante total disminuyó a los 25 y 100 días en los hombres, y a los 50 días volvió a niveles basales. En mujeres, la actividad antioxidante total disminuyó a los 25 y 50 días (figura 2).

Vuelve a llamar la atención la variabilidad en mujeres a los 100 días

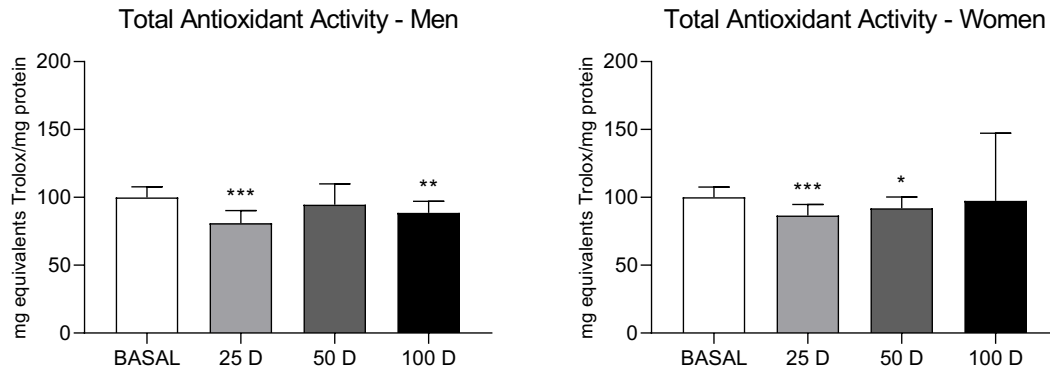


Figura 2. Actividad antioxidante total en hombres y mujeres.

COMPLEJOS DE LA CADENA TRANSPORTADORA DE ELECTRONES

Los resultados no mostraron diferencias significativas en la cantidad del complejo I (figura 3), pero parece que este se ve reducido ligeramente en las mujeres con el tiempo y no varía en los hombres.

La variabilidad a los 25 días en hombres es llamativa.

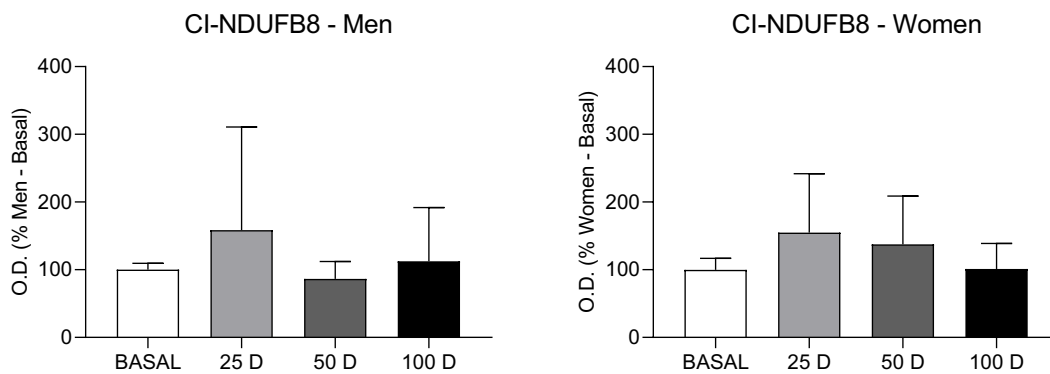


Figura 3. Complejo I de la cadena transportadora de electrones en hombres y mujeres.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en la cantidad del complejo II (figura 4), aunque probablemente debido a la altísima variabilidad.

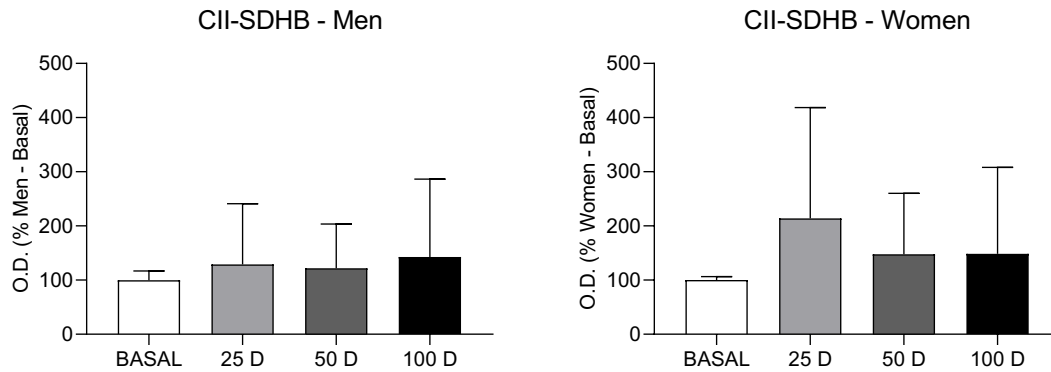


Figura 4. Complejo II de la cadena transportadora de electrones en hombres y mujeres.

Las diferencias en la expresión del complejo V encontradas a los 50 y 100 días hace imposible llevar a cabo un estudio estadístico (figura 5).

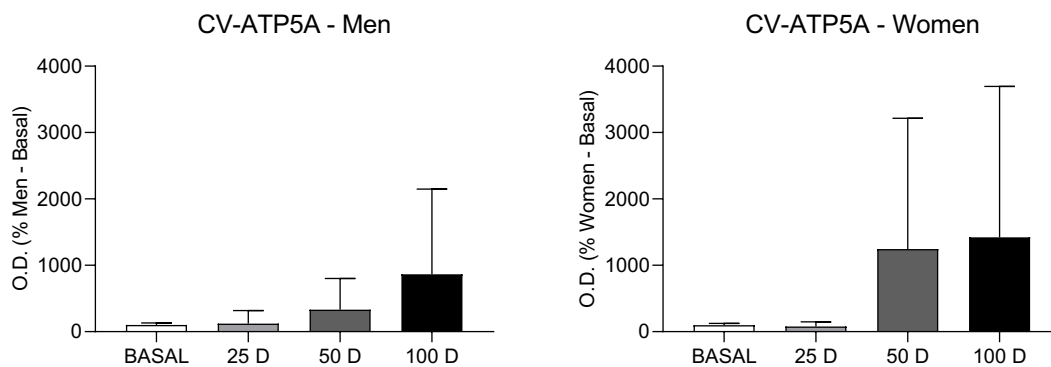


Figura 5. Complejo V de la cadena transportadora de electrones en hombres.

NIVELES DE ATP

Los resultados mostraron patrones similares tanto en hombres como en mujeres, con un incremento significativo de los niveles de ATP a los 100 días, incluso con la variabilidad observada. (figura 6).

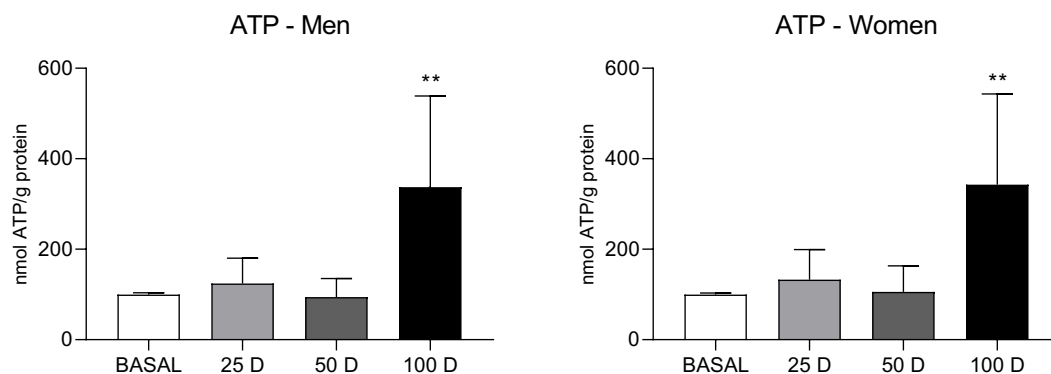


Figura 6. Niveles de ATP en hombres y mujeres.

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de la proteína p70 S6K fosforilada. Sin embargo, tanto en hombres como en mujeres hay un ligero aumento en la cantidad de esta proteína a los 50 días (figura 7).

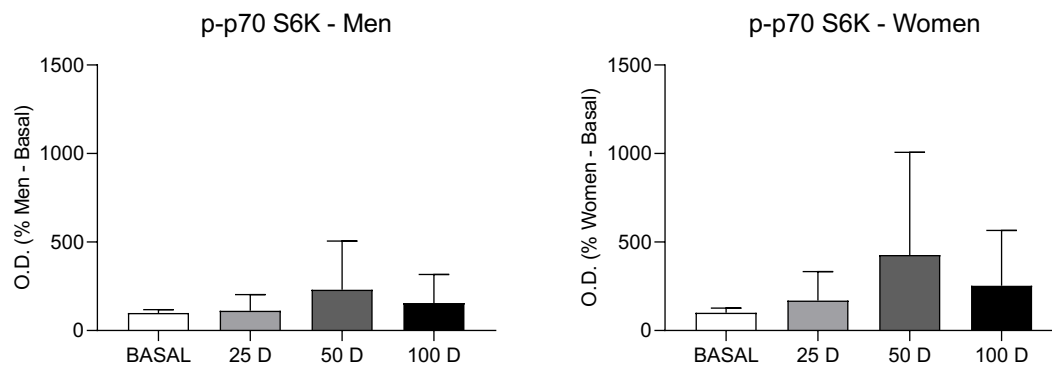


Figura 7. Niveles de p-p70 S6K en hombres y mujeres.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en los niveles de la proteína p70 S6K. Sin embargo, en los hombre hay un ligero aumento en la cantidad de esta proteína a los 25 días que se mantiene en el tiempo, y, en las mujeres, a los 50 días disminuye ligeramente y a los 100 días vuelve a disminuir (figura 8).

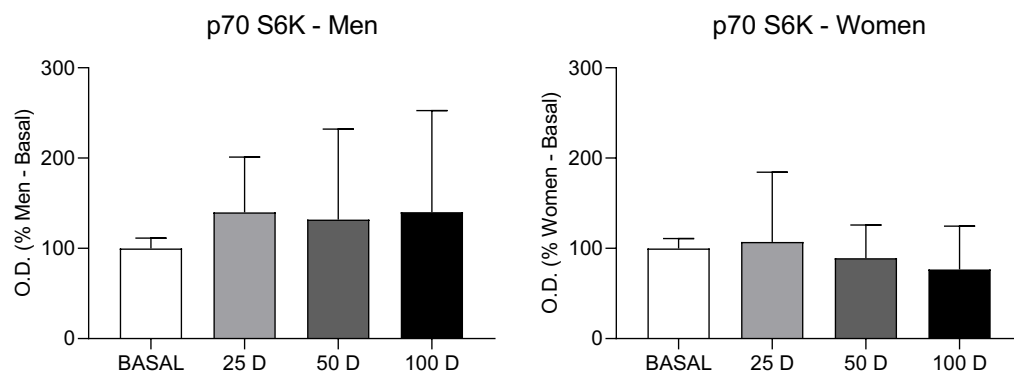


Figura 8. Niveles de p70 S6K en hombres y mujeres.

Los resultados mostraron que los niveles del ratio p-p70 S6K/p70 S6K se incrementaron significativamente a los 100 días en mujeres. Aunque no haya más diferencias significativas, se puede observar una tendencia en el incremento en el ratio a lo largo del tiempo (figura 9).

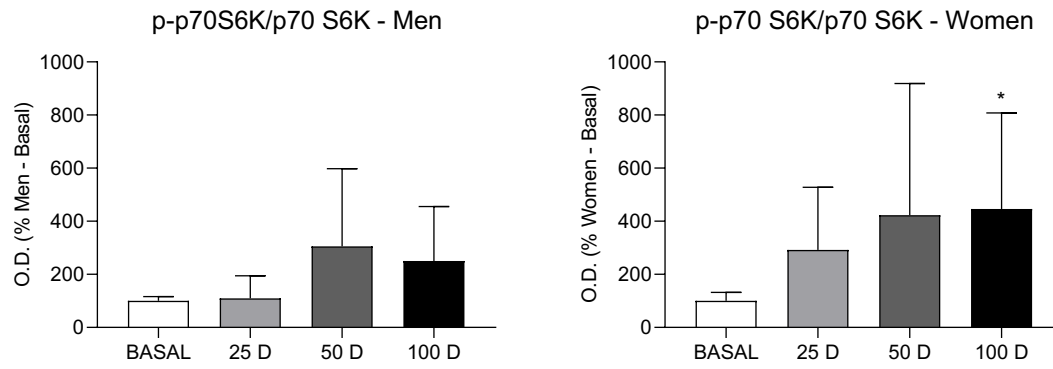


Figura 9. Ratio p-p70 S6K/p70 S6K en hombres y mujeres.

CERTIFICATE OF BEST PRESENTATION AWARD

ICPM003 2021: XV. International Conference on Plasma Medicine

hereby certifies that

ENRIQUE CASO PELÁEZ

has presented an outstanding work entitled

Cold Atmospheric Plasma-Activated Air Modulates Oxidative Response to Exposome, Inducing Tissue Phenotype Resilience

Eduardo Garcia-Antuna, Enrique Caso, Susana Rodriguez, J. Antonio Boja, Ana M. Coto

NEW YORK, UNITED STATES



AUGUST 09-10, 2021



Removal of Environmental Nanoparticles Increases Protein Synthesis and Energy Production in Healthy Humans

Eduardo Antuña^{1,2,3}, Juan Carlos Bermejo-Millo^{1,2,3}, Enrique Caso-Onzain^{4,5}, Enrique Caso-Peláez^{5,6,7}, Yaiza Potes^{1,2,3*} and Ana Coto-Montes^{1,2,3*}

¹Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Oviedo, Spain, ²Instituto de Investigación Sanitaria Del Principado de Asturias (ISPA), Av. Del Hospital Universitario, Oviedo, Spain, ³Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias (INEUROPA), University of Oviedo, Oviedo, Spain, ⁴Innovación Unit, BiowAir Total Systems SL, C/Michel Faraday, Gijón, Spain, ⁵Scientific CEO MyOmics SL, Gijón, Spain, ⁶System and Precision Medicine, Hospital Covadonga Gijón, Gijón, Spain, ⁷Biomedical Unit, BiowAir Total Systems SL, Gijón, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Segaran P. Pillai,
United States Department of Health
and Human Services, United States

Reviewed by:

María Lurdes Pinto,
University of Trás-os-Montes and Alto
Douro, Portugal
Bassam Ossama Hayek,
Independent Researcher, Amman,
Jordan

*Correspondence:

Yaiza Potes
potesyaiza@uniovi.es
Ana Coto-Montes
acoto@uniovi.es

Specialty section:

This article was submitted to
Biosafety and Biosecurity,
a section of the journal
Frontiers in Bioengineering and
Biotechnology

Received: 25 October 2021

Accepted: 24 January 2022

Published: 14 February 2022

Citation:

Antuña E, Carlos Bermejo-Millo J,
Caso-Onzain E, Caso-Peláez E,
Potes Y and Coto-Montes A (2022)
Removal of Environmental
Nanoparticles Increases Protein
Synthesis and Energy Production in
Healthy Humans.
Front. Bioeng. Biotechnol. 10:800011.
doi: 10.3389/fbioe.2022.800011

Currently, industrial activity causes the environmental release of nanoparticles that have multiple adverse effects on population health. There is a clear correlation between the increase in particulate air pollution and the increases in mortality and morbidity rates in both adults and children, which demonstrates the toxic effects of these particles. However, the effect of particle removal on healthy individuals is unknown. Thus, in this preliminary study, we showed, for the first time, how the filtering equipment that we used significantly reduced a large amount of nanoparticles in a minimum time and induced a reduction of oxidative damage in healthy individuals of both sexes after 25, 50 and 100 days of exposure. These effects led to increased protein synthesis and enhanced mitochondrial efficiency, thus resulting in a highly significant triggering of ATP synthesis. These results not only provide insight into the chronic effects that environmental nanoparticles have on individuals prior to the development of pathologies but also demonstrate a system capable of reversing nanoparticle toxicity and allowing cellular energy recovery.

Keywords: nanoparticles, air pollution, filtration, ATP, protein synthesis p70S6K, total antioxidant activity, mitochondria

1 INTRODUCTION

Environmental pollution is an unfavorable modification of our surroundings as a result of urbanism, population growth, solar radiation, and primarily, the industrial activity that human beings have expanded in recent years. Over the last few centuries, this activity has acquired special importance because of its exponential increase and the need of human beings to identify systems that can stop the resulting pollution in view of the increasing evidence of its effects in the medium and long-term exposure.

Exposure to particulate matter is frequently associated with pathogenic processes and even mortality (Brook et al., 2010), and particle size is one of the main defining characteristics that contributes to lethality. Moreover, particles are divided according to their aerodynamic sizes. Thus, particles with an aerodynamic size range between 10 and 2.5 μm (PM10-2.5) are known as the coarse fraction, whereas particles smaller than 2.5 μm (PM2.5) are known as the fine fraction. The so-called

ultrafine particles are those particles equal to or smaller than 0.1 μm , and those particles below 100 nm constitute nanoparticles (Gwinn and Vallyathan, 2006; Nemmar et al., 2013).

The proportion of nanoparticles with which we usually live, as well as the proportion that is spread in the air or contained in atomizers, has a significant influence on our state of health, due to the fact that they can be absorbed into our body through skin pores, weakened tissues and injections, as well as through olfactory, respiratory and intestinal tracts (Yah et al., 2012). Subsequently, they can be systematically disseminated, resulting in effects that have not yet been fully identified but are often harmful since they can function as cofactors or aggravators of undesirable biological events of diverse types, ranging from lung inflammation (Lopes et al., 2009) to chronic obstructive pulmonary disease (Rennard, 1998) and including different types of tumors (Nemmar et al., 2002; Warheit et al., 2004). Additionally, these effects can also result in damage to the brain (Oberdörster et al., 2004). Although these alterations have been well documented, with an increasing number of conditions being detected every day, the cellular mechanisms that are affected by the daily infiltration of nanoparticles remain practically unknown, which is a relatively recent field of health research.

The removal of these environmental nanoparticles, which is mainly accomplished by filtering processes, should significantly reduce the aforementioned effects, following a dose-response curve and depending on the sizes of the filtered particles, as well as being directly related to the basal state of the individual. However, the usual air filtering systems do not commonly interfere with the concentrations of the dispersed nanoparticles, as these particles are smaller than the pore or filtering system. This phenomenon has been widely documented in relation to the global infection of SARS-CoV-2, as the virion size is between 60 and 140 nm (Liu et al., 2020). Furthermore, air conditioners do not necessarily filter the air but can create an air recirculation system without external intake (Li et al., 2021), which keeps the concentration of nanoparticles unchanged. Therefore, effective strategies to reduce indoor air pollutant concentration events are critically needed.

Evidence shows differences between men and women in several health indicators. Globally, the life expectancy is greater for women than for men. However, women manifest higher degree of dependency in advanced ages (Institute of Medicine (US) Committee on Gender Differences in Susceptibility to Environmental Factors, 1998). Protein synthesis and cellular bioenergetics are considered as key molecular processes involved in cellular quality control and lifespan. Increased protein synthesis is associated with the improvement of cellular functioning by favoring the activation of protective pathways and the alleviation of cell death processes. Substantial alterations in protein synthesis that lead to protein malformations or misfolding eventually result in cell death (Rubio-González et al., 2020). Conversely, improvements in cellular function are evidenced by more efficient protein synthesis (Bermejo-Millo et al., 2018). The mammalian target of the rapamycin/ribosomal protein S6 kinase beta-1 pathway,

which is usually known as mTOR/p70S6K, is directly involved in the control of cell metabolism and growth, and its activation is directly related to protein synthesis and degradation processes (Zanchi and Lancha, 2008). Correspondingly, a lack of energy, which is mainly induced by mitochondrial malfunction, not only slows cellular processes (Poeggeler et al., 2005), but also triggers the production of oxygen free radicals that can cause irreparable damage to cellular macromolecules (Potes et al., 2019). Proteomics is a powerful strategy that allows for a precise approach to detect the modifications that the environment causes at the cellular level (Schinzel and Dillin, 2015), which can allow us to identify the specific level at which cellular mechanisms are affected.

The characterization of the adverse effects that the inhalation of nanoparticles causes at the cellular and molecular level in the general population is significantly hampered by the difficulty of obtaining a nanoparticle-free environment without also achieving sterility, which would be toxic to controls. However, we possess air filtration equipment that allows us to achieve an environment with a significant reduction of nanoparticles. Thus, the objective of the current study was to study the effect that the combination of air filtration and plasma ionization has on human health at the systemic and cellular levels. Our obtained results showed, for the first time, how this combined strategy can induce a reduction in oxidative damage in conjunction with a substantial improvement in both protein synthesis and energy production in healthy humans.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Participants

Fifty-eight individuals who were randomly selected from the Asturian population constituted the BioW cohort (BioW). All of the participants were independent, healthy and consisted of individuals of both sexes (28 men and 30 women), who ranged in age from 22 to 82 years ($\bar{x} = 55,59 \pm 14,59$). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Inclusions criteria for cohort incorporated the following: Individuals in good general health, with no relevant medical problems; well conditioned home with adequate thermal insulation; regular lifestyle with no significant alterations in daily life and adequate sleep hygiene. Barthel Index ≥ 80 in people over 65 years old.

Exclusion criteria included: Major illnesses and/or comorbidities; cognitive impairment; obesity (Body Mass Index BMI ≥ 30), irregular living, lack of adequate housing.

A longitudinal study of the temporal effect caused by the use of the nanoparticle remover (developed by BioW[®] [BioWAir Total System SL, Spain]) constituted the BioW group. The procedure was enacted in the following manner. The system was placed in the sleeping room of the participants, in order to ensure its effect for at least 6–8 h of restful sleep. The system was kept on for 24 h a day without interruption for the entire duration of the study. Moreover, the system was programmed to maintain the level of nanoparticle removal for 24 h a day. The obtained results were compared to the baseline levels of the same individuals at time 0.

Blood samples were collected prior to the use of the equipment and at 25, 50 and 100 days of use.

2.2 Nanoparticles Remover

During the study, the air quality in the locality was always maintained at adequate levels in terms of the concentration of suspended particulate matter, according to current Spanish legislation (Royal Decree 102/2011).

Nanoparticles were removed from the indoor space by applying an automatic, multilayer, heterogeneous broad spectrum nanofiltration system that is unique to the continuous generation of fluxes (BioW[®]). The system automatically integrates a complex continuous process, including 1) an inlet prefilter for the removal of larger impurities, 2) a bactericidal sheet, 3) a HEPA 13 filter (High Efficiency Particle Arresting), 4) an activated carbon layer that absorbs volatile substances (gases, fumes and odors) and eliminates volatile organic compounds (VOCs), 5) a heavy-duty stainless-steel filter designed for high airflows and ultraviolet (UV) baffle for platinum catalysis, 5) ultraviolet (UV) light for the denaturation of bacterial and viral genetic material, 6) a plasma ionizer to generate a charge change of the nanoparticles, thus inducing their agglutination for more effective filtering and 6) a plate for thermal sterilization at 200°C prior to laminar flow exit from the system.

The electrical installation of the enclosure where it was used complies with EC regulations. In this study, the device was placed in the bedroom, it was kept at a distance of no more than 2 m from the bed and the automatic mode was activated, in which the screen turns off in the absence of light and turns on in the presence of brightness. Thus, although the equipment would be on 24 h a day, it is expected that the most direct and effective effect would be realized during sleeping hours, which is the reason for the exclusion of volunteers who did not maintain an adequate sleep/wakefulness hygiene.

The equipment does not require any additional measures to be adopted in conditions that can be reasonably predicted, with regards variations in pressure, acceleration or thermal ignition sources. In terms of equipment fixed costs, in the study the device was free of charges, and no facility expenditures were necessary to prepare the site for system installation. Among variable costs, recurring cost for the operation of the system on electrical consumption (<22,4 W) was less than 1,00€ per month along the 3 months of study. Although, the system only requires filter annual replacement, due to the study period of time, there was no added cost for supply, material and maintenance during the 100 days the study protocol.

2.3 Nanoparticles Determination

The level of particulate matter (PM) in suspension (sizes 0.3; 0.5; 1.0; 2.5; 5.0 and 10) was tested by using a PC-220 (TROTEC) portable particle counter (Calibrated Serial number: 17020034, SGS Tecno SA & Comfort Direct) on indoor environmental samples from space dimensions that ranged between 23.75 m³ of minimum volume and 183.60 m³ of maximum volume. Tests on the volumetric flow rate, the air velocity and the outlet temperature of the system were also performed.

2.4 Blood Collection

Blood samples were extracted via venipuncture after an overnight fast. All of the venous blood samples were obtained before 10:00 a.m. to preclude circadian variation.

Collected blood samples were fractionated into plasma, erythrocytes and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) in a Ficoll-Paque Plus gradient (Ficoll-Paque Plus GE Healthcare) and stored at -80°C until further analysis, as has been previously described (de Gonzalo-Calvo et al., 2010, 2012). The Bradford method (Bradford, 1976) was used to measure plasma protein concentrations.

2.5 Oxidative Stress Studies

Protein oxidative damage (PD) was measured in plasma by using the methods described by Levine et al. (Levine et al., 1990), with modifications of Coto-Montes and Hardeland (Coto-Montes and Hardeland, 1999), for the determination of the concentrations of carbonylated proteins. The results are presented as nmol carbonylated protein/mg protein.

Total antioxidant activity (TAA) was determined in plasma by using the ABTS/H₂O₂/HRP method (Arnao et al., 2001), which was modified in our laboratory for plasma samples (de Gonzalo-Calvo et al., 2010, 2012). The results are expressed as equivalents of mg Trolox/g protein.

2.6 Western Blot Immunoassay

For the different western blot immunoassays, tissue homogenates (50 µg of protein per sample) were mixed with Laemmli sample buffer (BioRad Laboratories, Inc., CA, United States). The samples were fractionated by using SDS-PAGE at 200 V. After separation, protein was transferred to polyvinylidene fluoride membranes at 350 mA (Immobilon TM-P; Millipore Corp., MA, United States). β-actin (typical housekeeping protein) no showed significant variations in their levels; therefore, it was used to ensure equal loading. The membranes were incubated with the following primary antibodies: p-70S6 kinase (9,202, Cell Signaling); phospho-p-70S6 kinase (9,206, Cell Signaling); CI-20 (NDUFB8) (ab110242, Abcam, Cambridge, United Kingdom); CII-30 (SDHB) (ab14714, Abcam, Cambridge, United Kingdom) and CV (ATP5A) (ab14748, Abcam, Cambridge, United Kingdom). The membranes were incubated with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma-Aldrich, Missouri, United States). The membranes were developed using a chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (WBKLS0500, Millipore Corp., Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's instructions. Image Studio Lite 5.2.5 software (LI-COR Biosciences, Nebraska, United States) was used for the quantitative analysis.

2.7 ATP Production

Adenosine triphosphate (ATP) levels were determined by using a commercially available ATP bioluminescent kit (FLAA, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, United States). The assay was performed as indicated by the manufacturer. The results are expressed as nmol ATP/g protein.

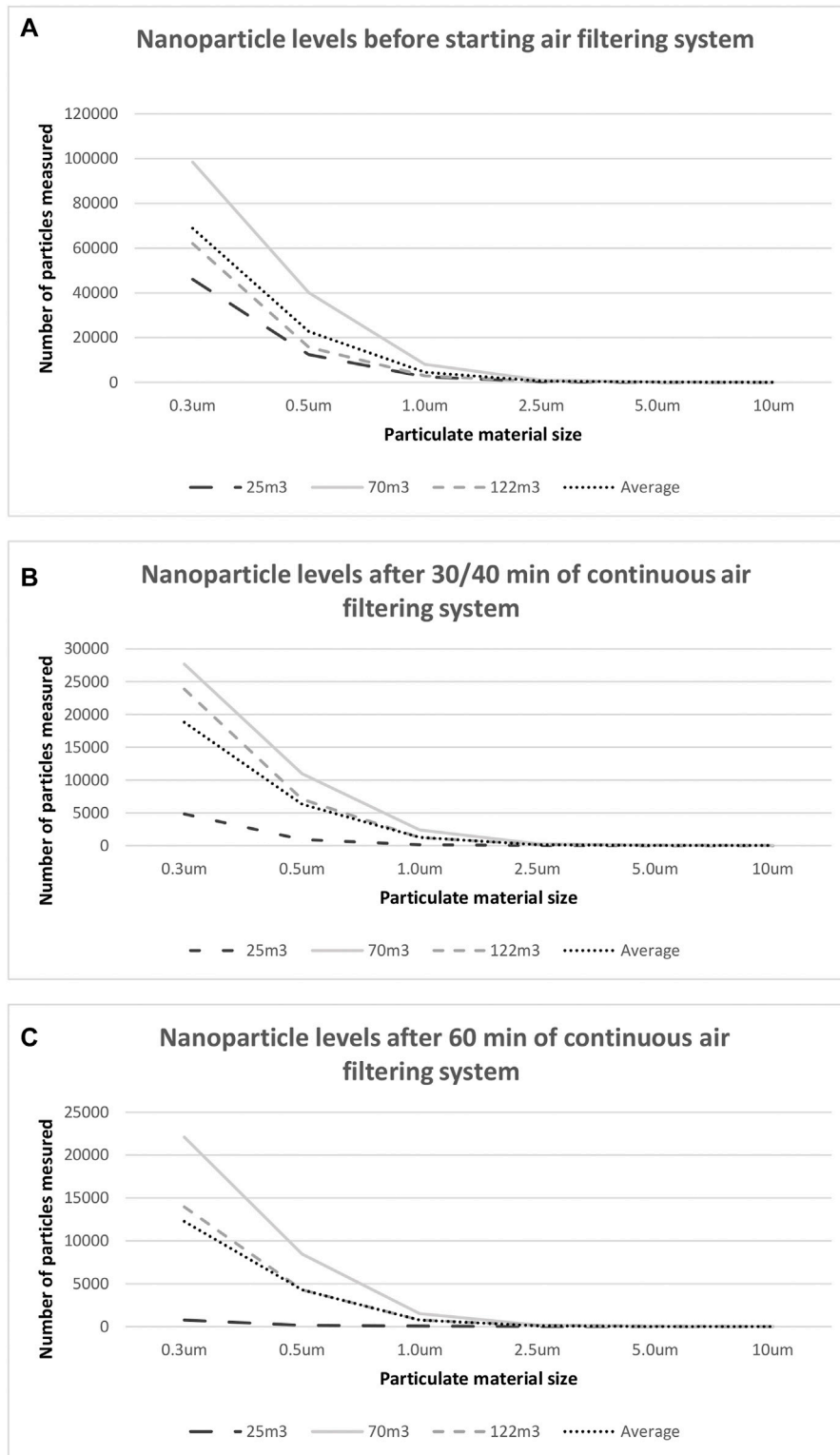


FIGURE 1 | Nanoparticle levels before starting air filtering system and after 30/40/60 min of continuous use air filtering system. Results from the detection test for particulate matter (PM) with different sizes (0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10 um) in the air present in several indoor 215 spaces; 25 m³ (dotted thick), 70 m³ (dashed thick), 122 m³ (dotted thin) and the average value (dashed thin). Total number of particles was measured at a rate of 2.83 L per minute and every 217 21 s, with intervals of 0.99 L. **(A)** before air filtering system; **(B)** after 30/40 min and 218 **(C)** after 60 min of continuous air filtering system.

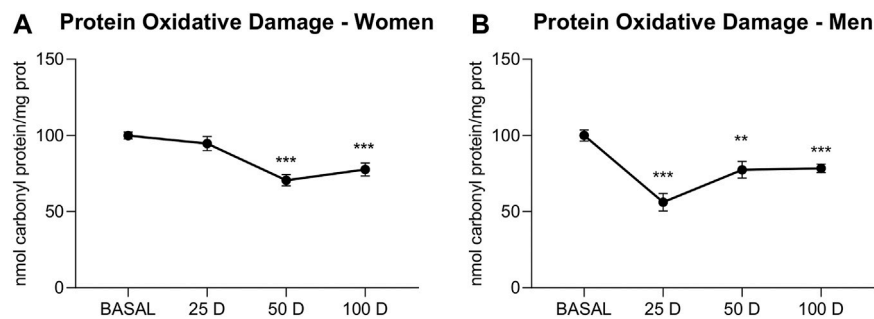


FIGURE 2 | Protein oxidative damage (expressed as nmol carbonyl protein/mg prot) of plasma extracted from women (A) and men (B) at baseline (BASAL), 25 days (25 D), 50 days (50 D) and 100 days (100 D). Data are mean \pm SEM. *BASAL vs. 25, 50 and 100 D. The number of symbols marks the level of significance: one for $p < 0.001$.

2.8 Statistical Analysis

The statistical software package SPSS 20.0.0 for Macintosh (SPSS Inc., Chicago, IL, United States) was used for all of the statistical analyses. The data are expressed as the mean and the standard error of the mean (SEM). The normality of the data was analyzed by using the Kolmogorov-Smirnov test. Comparisons between timepoints and between sexes were performed using the Student's *t*-test or Mann-Whitney *U* test for the continuous variables. Significance was accepted with $p < 0.05$.

3 RESULTS

These results are divided into two main groups, depending on whether they are related to the identification of equipment properties or to the effects produced at the cellular level.

3.1 Nanoparticle Determination

Before starting the study, nanoparticle detection tests were performed. The tests that were performed on environmental samples for PM in suspension showed a fast and effective reduction for PM of sizes 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10 μm in indoor spaces after 30, 40 and 60 min, being PM referring to particles in suspension with a diameter smaller than the number that accompanies it. **Figure 1** shows the levels of the different sizes of PM before the initiation of the system (**Figure 1A**), after 30/40 min (**Figure 1B**) and after 60 min (**Figure 1C**). The controls and tests showed that the volumetric flow rate, the air velocity and the outlet temperature of the system were 156.8, 224.5, and 284, 7 m^3/h for an average flow rate during the operation of the system at speeds 1, 2 and 3, respectively, and a temperature of $24.8^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. The results of this study showed very low levels of indoor airborne nanoparticles; in fact, the obtained levels of nanoparticles were maintained below the minimum limit established by the WHO for indoor spaces. Furthermore, a higher PM load in suspension indicated a greater reduction percentage that was obtained with the system.

3.2 Blood Studies

3.2.1 Oxidative Stress

Ionizing gas with high electrical energy based on the nature of the electrons, ions and neutral species modifies any pathway that is

directly or indirectly controlled by or related to reactive oxygen species (ROS) (Vandamme et al., 2012). Therefore, the study of the variations in the level of oxidative stress induced at the systemic level should be the first step in the investigation.

The results showed a significant decrease in PD (**Figure 2**) in all of the BioW groups; however, there were temporal differences regarding gender, due to the fact that men showed a significant reduction as early as 25 days (25 days $p < 0.001$; 50 days $p < 0.01$; 100 days $p < 0.01$), whereas in women, it was delayed until 50 days (50 days $p < 0.01$; 100 days $p < 0.01$).

Total antioxidant activity showed a generalized downward trend in the BioW groups (**Figure 3**), which was only significant at 25 and 50 days, in women (25 days $p < 0.01$; 50 days $p < 0.05$) and at 25 ($p < 0.001$) and 100 ($p < 0.05$) in men.

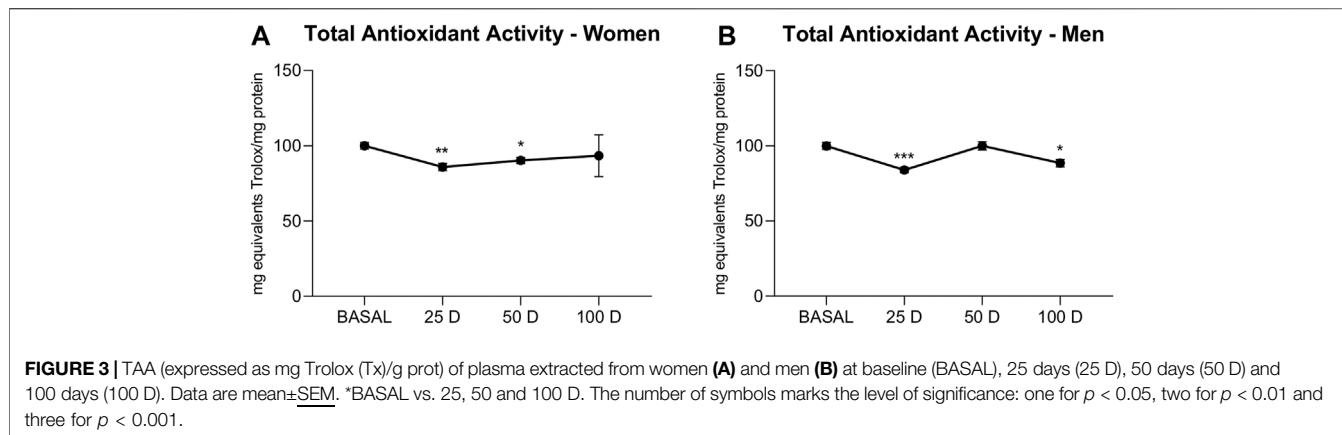
3.2.2 Protein Synthesis

p70S6K is activated by phosphorylation at threonine 389 (p-p70S6K), which induces protein synthesis and is commonly used as a marker of mTOR activation. However, this activation is directly dependent on the amount of total p70S6K in the medium; thus, the p-p70S6K/p70S6K ratio is the real indicator of the activation of protein synthesis (**Figure 4**).

The expression levels of p70S6K showed a clear decrease in the BLOW-treated groups, which was progressive in males and abrupt from 25 days in females (**Figure 4A**). The phosphorylation of p70S6K showed a similar pattern in both sexes, being more marked in women but without reaching significant differences between the different time periods. (**Figure 4B**). The ratio showed a gradual increase over time in females that was equivalent in males, although in this gender the increase started with a certain time delay (**Figure 4C**). Thus, the comparison between the sexes showed that in females, the increases were abrupt, with values much higher than those observed in males.

3.2.3 Mitochondrial Oxidative Phosphorylation

We hypothesized that the mitochondria could increase their efficiency with the reduction of environmental toxic elements; thus, the expression of subunits of the mitochondrial electron transport chain complexes was evaluated. Immunoblotting revealed that mitochondrial complexes I, II and V varied slightly in activity over time, showing a similar pattern in both



sexes. While complex I and II showed small reductions, being significant this reduction in complex I for men (25 days $p < 0.001$; 100 days $p < 0.05$) and in complex II for women (100 days $p < 0.01$), complex V showed an increase in its activity, mainly after 50 days in both sexes without reaching significant levels (Figure 5).

3.2.4 Energy Production

To characterize energy levels, ATP production was studied (Figure 6). The increase in ATP levels showed a similar pattern for both sexes, with a significant increase compared to basal levels at 25 days of treatment ($p < 0.001$ for women; $p < 0.01$ for men), a decreased again at 50 days ($p < 0.05$ for women; $p < 0.01$ for men), and an abrupt spike at 100 days of treatment with BioW ($p < 0.001$ in both sexes), representing an increase of fourfold in men and women compared with the baseline levels.

4 DISCUSSION

The extraordinary increase in pollutants with which human beings must coexist on a daily basis (especially in industrialized areas), encompassed under the term pollution, presents a toxic environment that has a multifactorial effect on health (Hoet et al., 2004). This level of toxicity has recently been compounded by alterations in the physical and chemical properties of apparently innocuous products, thus leading to an increase in toxicity at the nanoscopic level that can elicit harmful consequences for workers, the environment and society in general (Service, 2004; Lee et al., 2005). This environmental contamination favors the development of gastrointestinal diseases (Bhavsar and Amiji, 2007), dermatitis (Monteiro-Riviere, 2021) and eye disorders (Järvinen et al., 1995), which can significantly reduce the immune capacity against infections (Favarato et al., 2021; Katoto et al., 2021) and enhance the development of tumor processes (Coleman et al., 2021; Khorrami et al., 2021; Rojas-Rueda et al., 2021). Recent results have highlighted the important toxic role played by ultrafine particles and nanoparticles in these air pollution-induced pathological processes (Maher et al., 2020).

The use of nanofiltration equipment is very effective in reducing the pathological processes related to environmental pollution, such as silicosis or viral infections (Boczkowski and Hoet, 2010; Fermo et al., 2021), whereas exposure to nanoparticles has been shown to be a major risk for morbidity and mortality (Nishihama et al., 2021). However, the beneficial effects of the removal of such nanoparticles for healthy subjects or in the absence of pathologies are not currently known.

Studies showing a direct relationship between exposure to air pollution and an increase in ROS (Møller et al., 2010) are abundant. These highly unstable species can damage all types of biological macromolecules in their vicinity, thus causing a high degree of cellular deterioration (Hardeland et al., 2003). In humans, biomonitoring studies have demonstrated a clear association between wood smoke particles or air pollution and oxidative damage at the deoxynucleotide and lipid levels, which significantly reduces both the quality of life and the future health prospects of the population subjected to these effects. Different nanoparticles have shown an oxidative effect on biological membranes by increasing the protein carbonylation induced by oxidative damage to these molecules; these effects can, in some cases, be reversed with antioxidants (Kamat et al., 2000). Likewise, *in vitro* studies have shown that, among the effects of nanoparticles, a reduction in the antioxidant capacity can increase the initial damage to proteins (Møller et al., 2010). However, our results showed a significant and direct time-dependent reduction in oxidative damage to proteins in both male and female BioW subjects. Curiously, the decline in protein oxidative damage found in women begins at 50 days, exhibiting a delay compared to men. The described delay may be due to the different gender-based susceptibility to stressors, in which sex hormones seem to play an critical role (Institute of Medicine (US) Committee on Gender Differences in Susceptibility to Environmental Factors, 1998; Kingston et al., 2017).

Protein synthesis, which is mainly performed by the endoplasmic reticulum, is a delicate process that is easily uncoupled and hampered. From viral or bacterial infections (Chamberlain and Anathy, 2020; Alshareef et al., 2021) to the development of any neurodegenerative disease (Ghemrawi and Khair, 2020; Schneider et al., 2021), reticulum stress is a common cellular manifestation of such pathologies. Endoplasmic

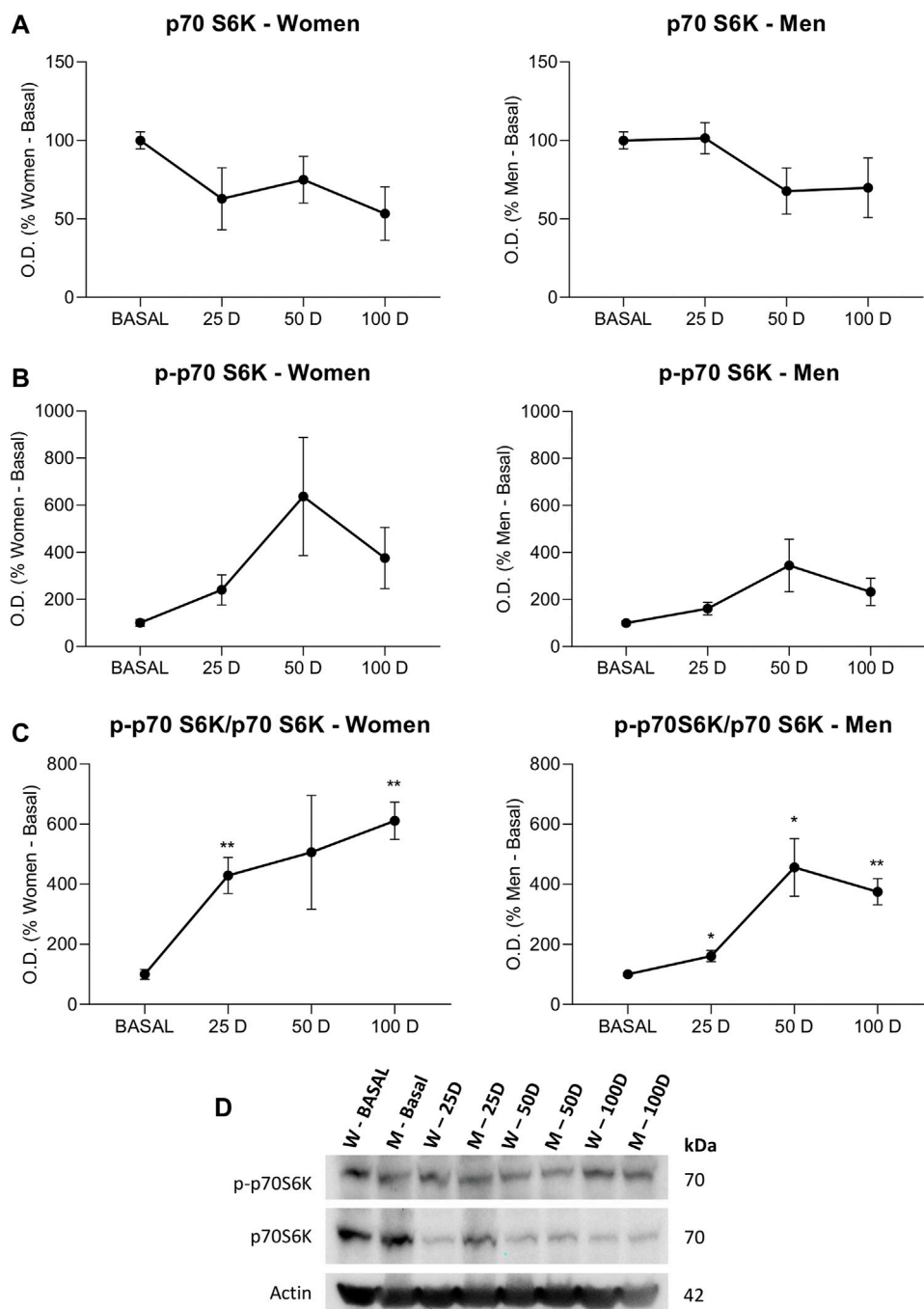
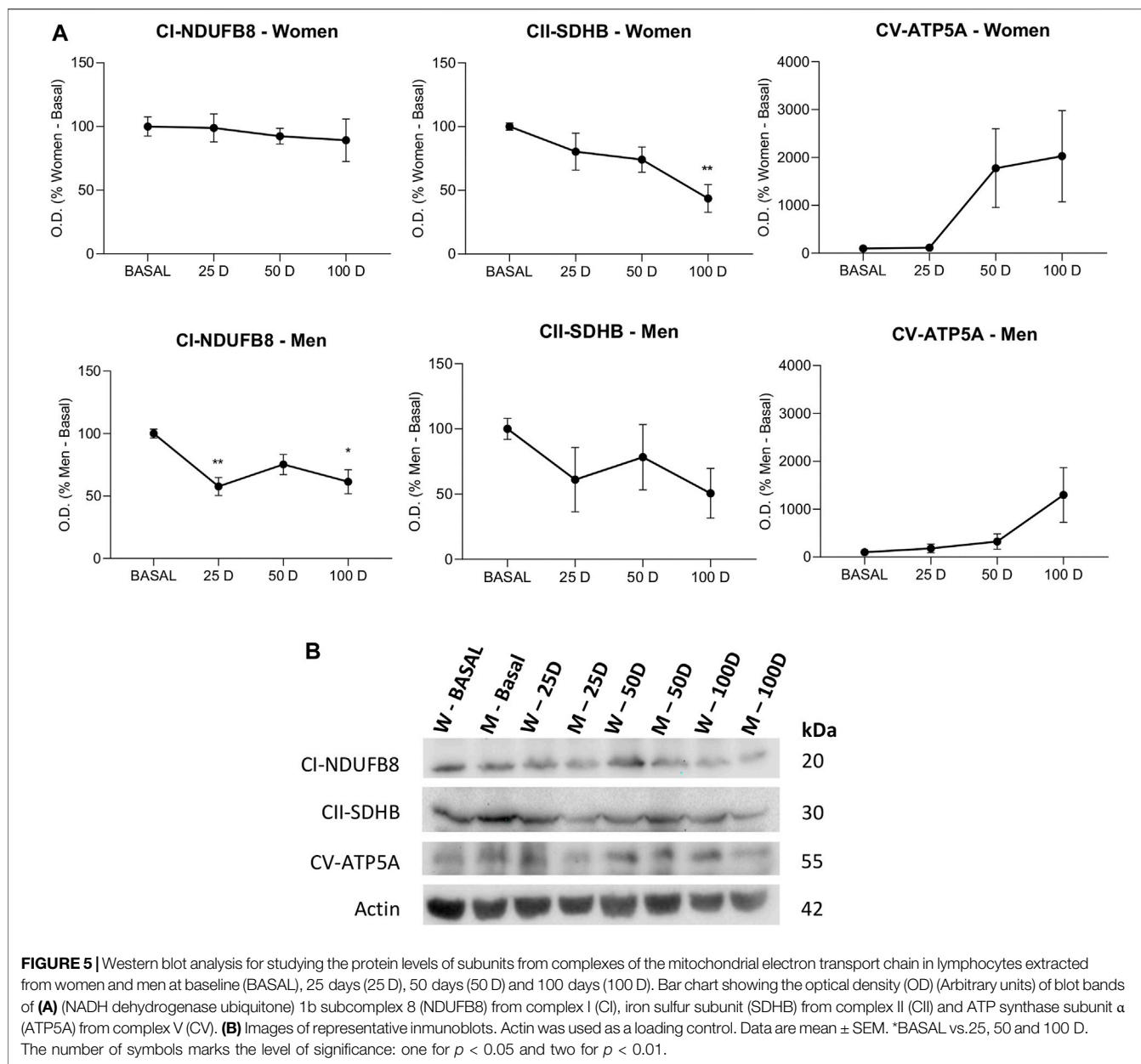


FIGURE 4 | Western blot analysis for studying protein synthesis pathway in lymphocytes extracted from women and men at baseline (BASAL), 25 days (25 D), 50 days (50 D) and 100 days (100 D). Bar chart showing the optical density (OD) (Arbitrary units) of blot bands of **(A)** p70S6K, **(B)** p-p70S6K and **(C)** p-p70S6K/p70S6K, **(D)** Images of representative immunoblots. Actin was used as a loading control. Data are mean ± SEM. *BASAL vs. 25 D, 50 D and 100 D. The number of symbols marks the level of significance: one for $p < 0.05$, two for $p < 0.01$ and three for $p < 0.001$.

reticulum stress regulates mTOR, which in turn, modulates cell growth and protein synthesis through the phosphorylation of p70S6K. Moreover, mTOR/p70S6K signaling is tightly involved in the regulation of cellular quality control processes. The inhibition of mTOR and the reduction in energy production triggers autophagy that acts as a survival mechanism and

ultimately decides whether apoptosis should proceed or not (Duan et al., 2016; Prieto-Domínguez et al., 2017). The recovery of the control of the protein synthesis is much more complicated and has been demonstrated in few cases, such as with treatment with melatonin, which is a potent antioxidant whose activity as a recovery factor of endoplasmic activity as an



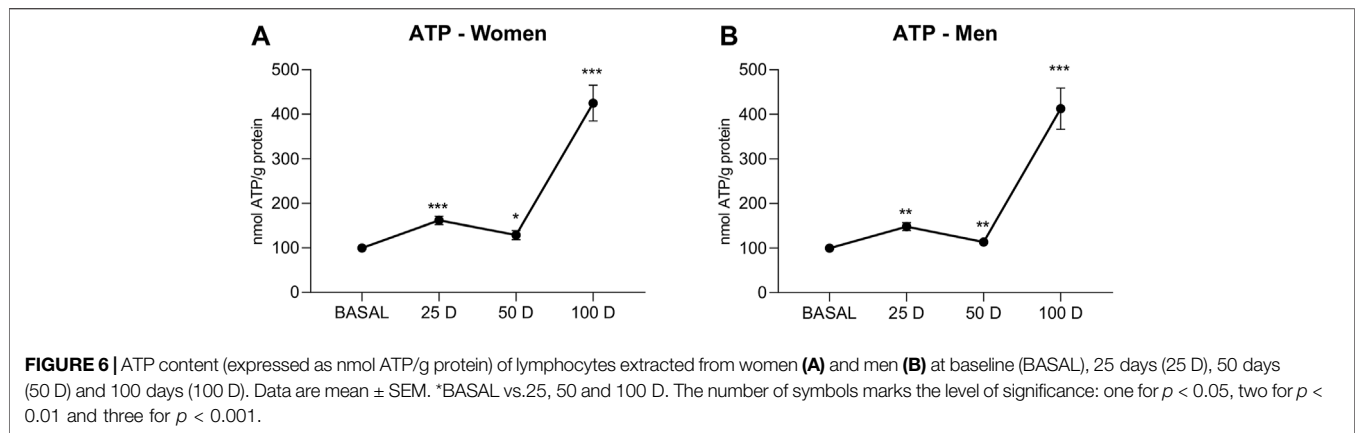
autophagy regulator has been widely demonstrated (Aouichat et al., 2021). However, this increase requires energy in all cases.

Energy production, whether aerobic or anaerobic, is essential for cell survival, and no pathologies associated with energy overproduction have been described. The finding of increased ATP levels with temporary exposure to BioW can only be related to enhanced mitochondrial functioning and efficient metabolic activity upon the removal of environmental nanoparticles (Møller et al., 2010). The reduction in ATP synthesis due to mitochondrial damage in a nanoparticle-rich environment has been known for a long time (Ueng et al., 1997). Thus, nanoparticles can induce a reduction in the efficiency of the electron transport chain that is accompanied by an inhibition of the ADP transporter into the mitochondria, thus leading to an

increase in the production of oxidative stress (Hussain et al., 2005) that can trigger cell death via apoptosis (Xia et al., 2004).

It should be emphasized that in our study, there were no significant variations in the expression of OXPHOS even though its activity was necessarily increased, indicating an increase in its effectiveness. This essential difference directly correlates with ATP production, which is significantly increased with the reduction of environmental nanoparticles. Hence, the observed reduction in the expression of these complexes is evidence of improved mitochondrial efficiency. Many articles have shown a decrease in mitochondrial efficiency under stressful conditions, such as aging (Gonzalez-Freire et al., 2018) and disease.

Several agents are known to increase ATP production, including drugs that allow for recovery from disease and



treatments that induce an overproduction of energy in healthy individuals. Thus, physical exercise (Vigh-Larsen et al., 2021) and various antioxidants, such as melatonin and vitamin D (Latham et al., 2021; Reiter et al., 2021), have been shown to play a dynamizing role in mitochondria by increasing ATP production in these organelles. To our knowledge, no nanofiltration equipment, except for the one used in the present study, has been shown to enhance cellular energy production. Again, the results seem to mimic an antioxidant effect at the cellular level and allow us to conclude that the effective removal of nanoparticles leads to an improvement in cellular effectiveness and efficiency, even in healthy individuals.

5 CONCLUSION

Our results have shown, for the first time to our knowledge, that the fall of environmental nanoparticles, induced by BioW remover, causes in healthy people a reduction of oxidative stress, denoted by a reduction of oxidative damage to proteins and a clear decrease in antioxidant capacity in both men and women and assessing a wide age range. In view of this oxidative environment reduction, protein synthesis and mitochondrial capacity for energy production are enhanced in a time-dependent manner. The optimization of the activity of the most oxidative stress-susceptible organelles within the cell seems to be behind both effects, suggesting an important role of environmental nanoparticles in the progressive and premature cellular depletion.

REFERENCES

- Alshareef, M. H., Hartland, E. L., and McCaffrey, K. (2021). Effectors Targeting the Unfolded Protein Response during Intracellular Bacterial Infection. *Microorganisms* 9, 705. doi:10.3390/microorganisms9040705
- Aouichat, S., Navarro-Alarcon, M., Alarcón-Guijo, P., Salagre, D., Ncir, M., Zourgui, L., et al. (2021). Melatonin Improves Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated IRE1 α Pathway in Zucker Diabetic Fatty Rat. *Pharmaceuticals* 14, 232. doi:10.3390/ph14030232

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Central University Hospital of Asturias (HUCA) (2020.141, 12/03/2020). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, YP and AC-M; methodology, YP and AC-M; software, EA and JB-M; investigation, EA, JB-M, EC-O, and EC-P; writing—original draft preparation, EA and JB-M; writing—review and editing, YP and AC-M; supervision, YP and AC-M; funding acquisition, AC-M.

FUNDING

This work was supported by: ISPA-BioW/20-21.

- Arnao, M. B., Cano, A., and Acosta, M. (2001). The Hydrophilic and Lipophilic Contribution to Total Antioxidant Activity. *Food Chem.* 73, 239–244. doi:10.1016/S0308-8146(00)00324-1
- Bermejo-Millo, J. C., Guimarães, M. R. M., de Luxán-Delgado, B., Potes, Y., Pérez-Martínez, Z., Díaz-Luis, A., et al. (2018). High-Fructose Consumption Impairs the Redox System and Protein Quality Control in the Brain of Syrian Hamsters: Therapeutic Effects of Melatonin. *Mol. Neurobiol.* 55, 7973–7986. doi:10.1007/s12035-018-0967-2
- Bhavsar, M. D., and Amiji, M. M. (2007). Gastrointestinal Distribution and *In Vivo* Gene Transfection Studies with Nanoparticles-In-Microsphere Oral System (NiMOS). *J. Controlled Release* 119, 339–348. doi:10.1016/j.jconrel.2007.03.006

- Boczkowski, J., and Hoet, P. (2010). What's New in Nanotoxicology? Implications for Public Health from a Brief Review of the 2008 Literature. *Nanotoxicology* 4, 1–14. doi:10.3109/17435390903428844
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:10.1006/abio.1976.999910.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brook, R. D., Rajagopalan, S., Pope, C. A., Brook, J. R., Bhatnagar, A., Diez-Roux, A. V., et al. (2010). Particulate Matter Air Pollution and Cardiovascular Disease. *Circulation* 121, 2331–2378. doi:10.1161/CIR.0b013e3181d8bec1
- Chamberlain, N., and Anathy, V. (2020). Pathological Consequences of the Unfolded Protein Response and Downstream Protein Disulphide Isomerases in Pulmonary Viral Infection and Disease. *J. Biochem.* 167, 173–184. doi:10.1093/jb/mvz101
- Coleman, N. C., Ezzati, M., Marshall, J. D., Robinson, A. L., Burnett, R. T., and Pope, C. A. (2021). Fine Particulate Matter Air Pollution and Mortality Risk Among US Cancer Patients and Survivors. *JNCI Cancer Spectr.* 5, pkab001. doi:10.1093/jncics/pkab001
- Coto-Montes, A., and Hardeland, R. (1999). Antioxidative Effects of Melatonin in *Drosophila melanogaster*: Antagonization of Damage Induced by the Inhibition of Catalase. *J. Pineal Res.* 27, 154–158. doi:10.1111/j.1600-079x.1999.tb00610.x
- de Gonzalo-Calvo, D., de Luxán-Delgado, B., Rodríguez-González, S., García-Macia, M., Suárez, F. M., Solano, J. J., et al. (2012). Interleukin 6, Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor I and Red Blood Cell Distribution Width as Biological Markers of Functional Dependence in an Elderly Population: a Translational Approach. *Cytokine* 58, 193–198. doi:10.1016/j.cyto.2012.01.005
- de Gonzalo-Calvo, D., Neitzert, K., Fernández, M., Vega-Naredo, I., Caballero, B., García-Macia, M., et al. (2010). Differential Inflammatory Responses in Aging and Disease: TNF- α and IL-6 as Possible Biomarkers. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 733–737. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.05.019
- Duan, P., Quan, C., Huang, W. T., and Yang, K. D. (2016). PI3K-Akt/LKB1-AMPK-mTOR-p70S6K/4EBP1 Signaling Pathways Participate in the Regulation of Testis Development and Spermatogenesis: An Update. *Zhonghua Nan Ke Xue* 22, 1016–1020.
- Favarato, G., Clemens, T., Cunningham, S., Dibben, C., Macfarlane, A., Milojevic, A., et al. (2021). Air Pollution, Housing and Respiratory Tract Infections in Children: National Birth Cohort Study (PICNIC): Study Protocol. *BMJ Open* 11, e048038. doi:10.1136/bmjopen-2020-048038
- Fermo, P., Artifano, B., De Gennaro, G., Pantaleo, A. M., Parente, A., Battaglia, F., et al. (2021). Improving Indoor Air Quality through an Air Purifier Able to Reduce Aerosol Particulate Matter (PM) and Volatile Organic Compounds (VOCs): Experimental Results. *Environ. Res.* 197, 111131. doi:10.1016/j.envres.2021.111131
- Ghemrawi, R., and Khair, M. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases. *Ijms* 21, 6127. doi:10.3390/ijms21176127
- Gonzalez-Freire, M., Adelnia, F., Moaddel, R., and Ferrucci, L. (2018). Searching for a Mitochondrial Root to the Decline in Muscle Function with Ageing. *J. Cachexia, Sarcopenia Muscle* 9, 435–440. doi:10.1002/jcsm.12313
- Gwinn, M. R., and Vallyathan, V. (2006). Nanoparticles: Health Effects-Pros and Cons. *Environ. Health Perspect.* 114, 1818–1825. doi:10.1289/ehp.8871
- Hardeland, R., Coto-Montes, A., and Poeggeler, B. (2003). Circadian Rhythms, Oxidative Stress, and Antioxidative Defense Mechanisms. *Chronobiology Int.* 20, 921–962. doi:10.1081/cbi-120025245
- Hoet, P. H., Brüske-Hohlfeld, I., and Salata, O. V. (2004). Nanoparticles - Known and Unknown Health Risks. *J. Nanobiotechnol* 2, 12. doi:10.1186/1477-3155-2-12
- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., and Schlager, J. J. (2005). *In Vitro* toxicity of Nanoparticles in BRL 3A Rat Liver Cells. *Toxicol. Vitro* 19, 975–983. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.034
- Järvinen, K., Järvinen, T., and Urtti, A. (1995). Ocular Absorption Following Topical Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 16, 3–19. doi:10.1016/0169-409X(95)00010-5
- Kamat, J., Devasagayam, T. P., Priyadarsini, K. I., and Mohan, H. (2000). Reactive Oxygen Species Mediated Membrane Damage Induced by Fullerene Derivatives and its Possible Biological Implications. *Toxicology* 155, 55–61. doi:10.1016/s0300-483x(00)00277-8
- Katoto, P. D. M. C., Brand, A. S., Bakan, B., Obadia, P. M., Kuhangana, C., Kayembe-Kitenge, T., et al. (2021). Acute and Chronic Exposure to Air Pollution in Relation with Incidence, Prevalence, Severity and Mortality of COVID-19: a Rapid Systematic Review. *Environ. Health* 20, 41. doi:10.1186/s12940-021-00714-1
- Khorrami, Z., Pourkhosravi, M., Rezapour, M., Etemad, K., Taghavi-Shahri, S. M., Künzli, N., et al. (2021). Multiple Air Pollutant Exposure and Lung Cancer in Tehran, Iran. *Sci. Rep.* 11, 9239. doi:10.1038/s41598-021-88643-4
- Kingston, A., Wohland, P., Wittenberg, R., Robinson, L., Brayne, C., Matthews, F. E., et al. (2017). Is Late-Life Dependency Increasing or Not? A Comparison of the Cognitive Function and Ageing Studies (CFAS). *The Lancet* 390, 1676–1684. doi:10.1016/S0140-6736(17)31575-1
- Latham, C. M., Brightwell, C. R., Keeble, A. R., Munson, B. D., Thomas, N. T., Zagzoog, A. M., et al. (2021). Vitamin D Promotes Skeletal Muscle Regeneration and Mitochondrial Health. *Front. Physiol.* 12, 660498. doi:10.3389/fphys.2021.660498
- Lee, B., Qi, L., and Copeland, T. (2005). Nanoparticles for Materials Design: Present & Future. *J. Ceram. Process. Res.* 6, 31–40.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., et al. (1990). [49] Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464–478. doi:10.1016/0076-6879(90)86141-h
- Li, Y., Qian, H., Hang, J., Chen, X., Cheng, P., Ling, H., et al. (2021). Probable Airborne Transmission of SARS-CoV-2 in a Poorly Ventilated Restaurant. *Building Environ.* 196, 107788. doi:10.1016/j.buildenv.2021.107788
- Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y., Guo, M., Liu, Y., Gali, N. K., et al. (2020). Aerodynamic Analysis of SARS-CoV-2 in Two Wuhan Hospitals. *Nature* 582, 557–560. doi:10.1038/s41586-020-2271-3
- Lopes, F. D. T. Q. S., Pinto, T. S., Arantes-Costa, F. M., Moriya, H. T., Biselli, P. J. C., Ferraz, L. F. S., et al. (2009). Exposure to Ambient Levels of Particles Emitted by Traffic Worsens Emphysema in Mice. *Environ. Res.* 109, 544–551. doi:10.1016/j.envres.2009.03.002
- Maher, B. A., González-Macié, A., Reynoso-Robles, R., Torres-Jardón, R., and Calderón-Garcidueñas, L. (2020). Iron-rich Air Pollution Nanoparticles: An Unrecognised Environmental Risk Factor for Myocardial Mitochondrial Dysfunction and Cardiac Oxidative Stress. *Environ. Res.* 188, 109816. doi:10.1016/j.envres.2020.109816
- Møller, P., Jacobsen, N. R., Folkmann, J. K., Danielsen, P. H., Mikkelsen, L., Hemmingsen, J. G., et al. (2010). Role of Oxidative Damage in Toxicity of Particulates. *Free Radic. Res.* 44, 1–46. doi:10.3109/10715760903300691
- Monteiro-Riviere, N. A. (2021). *Anatomical Factors Affecting Barrier Function*. Seventh Edition. Boca Raton, FL: Dermatotoxicology. Available at: https://www.academia.edu/44620577/Anatomical_Factors_Affecting_Barrier_Function (Accessed July 29, 2021).
- Nemmar, A., Hoet, P. H. M., Vanquickenborne, B., Dinsdale, D., Thomeer, M., Hoylaerts, M. F., et al. (2002). Passage of Inhaled Particles into the Blood Circulation in Humans. *Circulation* 105, 411–414. doi:10.1161/hc0402.104118
- Nemmar, A., Holme, J. A., Rosas, I., Schwarze, P. E., and Alfaro-Moreno, E. (2013). Recent Advances in Particulate Matter and Nanoparticle Toxicology: A Review of the *In Vivo* and *In Vitro* Studies. *Biomed. Res. Int.* 2013, 1–22. doi:10.1155/2013/279371
- Nishihama, Y., Jung, C.-R., Nakayama, S. F., Tamura, K., Isobe, T., Michikawa, T., et al. (2021). Indoor Air Quality of 5,000 Households and its Determinants. Part A: Particulate Matter (PM_{2.5} and PM_{10-2.5}) Concentrations in the Japan Environment and Children's Study. *Environ. Res.* 198, 111196. doi:10.1016/j.envres.2021.111196
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., et al. (2004). Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhalation Toxicol.* 16, 437–445. doi:10.1080/08958370490439597
- Poeggeler, B., Durand, G., Polidori, A., Pappolla, M. A., Vega-Naredo, I., Coto-Montes, A., et al. (2005). Mitochondrial Medicine: Neuroprotection and Life Extension by the New Amphiphilic Nitrone LPBNAH1 Acting as a Highly Potent Antioxidant Agent. *J. Neurochem.* 95, 962–973. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03425.x
- Potes, Y., Pérez-Martínez, Z., Bermejo-Millo, J. C., Rubio-Gonzalez, A., Fernandez-Fernández, M., Bermudez, M., et al. (2019). Overweight in the Elderly Induces a Switch in Energy Metabolism that Undermines Muscle Integrity. *Aging Dis.* 10, 217–230. doi:10.14336/AD.2018.0430

- Prieto-Domínguez, N., Méndez-Blanco, C., Carbajo-Pescador, S., Fondevila, F., García-Palomo, A., González-Gallego, J., et al. (2017). Melatonin Enhances Sorafenib Actions in Human Hepatocarcinoma Cells by Inhibiting mTORC1/p70S6K/HIF-1 α and Hypoxia-Mediated Mitophagy. *Oncotarget* 8, 91402–91414. doi:10.18632/oncotarget.20592
- Reiter, R. J., Sharma, R., and Rosales-Corral, S. (2021). Anti-Warburg Effect of Melatonin: A Proposed Mechanism to Explain its Inhibition of Multiple Diseases. *Ijms* 22, 764. doi:10.3390/ijms22020764
- Rennard, S. I. (1998). COPD: Overview of Definitions, Epidemiology, and Factors Influencing its Development. *Chest* 113, 235S–241S. doi:10.1378/chest.113.4_supplement.235s
- Rojas-Rueda, D., Alsufyani, W., Herbst, C., AlBalawi, S., Alsukait, R., and Alomran, M. (2021). Ambient Particulate Matter burden of Disease in the Kingdom of Saudi Arabia. *Environ. Res.* 197, 111036. doi:10.1016/j.envres.2021.111036
- Rubio-González, A., Reiter, R. J., De Luxán-Delgado, B., Potes, Y., Caballero, B., Boga, J. A., et al. (2020). Pleiotropic Role of Melatonin in Brain Mitochondria of Obese Mice. *Melatonin Res.* 3, 538–557. doi:10.32794/mr11250078
- Schinzel, R., and Dillin, A. (2015). Endocrine Aspects of Organelle Stress - Cell Non-autonomous Signaling of Mitochondria and the ER. *Curr. Opin. Cel Biol.* 33, 102–110. doi:10.1016/j.cel.2015.01.006
- Schneider, B., Baudry, A., Pietri, M., Alleaume-Butaux, A., Bizingre, C., Nioche, P., et al. (2021). The Cellular Prion Protein-ROCK Connection: Contribution to Neuronal Homeostasis and Neurodegenerative Diseases. *Front. Cel. Neurosci.* 15, 660683. doi:10.3389/fncel.2021.660683
- Service, R. F. (2004). Nanotechnology Grows up. *Science* 304, 1732–1734. doi:10.1126/science.304.5678.1732
- Ueng, T., Kang, J. J., Wang, H. W., Cheng, Y. W., and Chiang, L. Y. (1997). Suppression of Microsomal Cytochrome P450-dependent Monooxygenases and Mitochondrial Oxidative Phosphorylation by Fullerol, a Polyhydroxylated Fullerene C60. *Toxicol. Lett.* 93, 29–37. doi:10.1016/s0378-4274(97)00071-4
- Vandamme, M., Robert, E., Lerondel, S., Sarron, V., Ries, D., Dozias, S., et al. (2012). ROS Implication in a New Antitumor Strategy Based on Non-thermal Plasma. *Int. J. Cancer* 130, 2185–2194. doi:10.1002/ijc.26252
- Vigh-Larsen, J. F., Ørtenblad, N., Spriet, L. L., Overgaard, K., and Mohr, M. (2021). Muscle Glycogen Metabolism and High-Intensity Exercise Performance: A Narrative Review. *Sports Med.* 51, 1855–1874. doi:10.1007/s40279-021-01475-0
- Institute of Medicine (US) Committee on Gender Differences in Susceptibility to Environmental Factors (1998). in *Gender Differences in Susceptibility to Environmental Factors: A Priority Assessment: Workshop Report*. Editors V. P. Setlow, C. E. Lawson, and N. F. Woods (Washington (DC): National Academies Press). (US) Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100873/>(Accessed September 23, 2021).
- Warheit, D. B., Laurence, B. R., Reed, K. L., Roach, D. H., Reynolds, G. a. M., and Webb, T. R. (2004). Comparative Pulmonary Toxicity Assessment of Single-wall Carbon Nanotubes in Rats. *Toxicol. Sci.* 77, 117–125. doi:10.1093/toxsci/kfg228
- Xia, T., Korge, P., Weiss, J. N., Li, N., Venkatesen, M. I., Sioutas, C., et al. (2004). Quinones and Aromatic Chemical Compounds in Particulate Matter Induce Mitochondrial Dysfunction: Implications for Ultrafine Particle Toxicity. *Environ. Health Perspect.* 112, 1347–1358. doi:10.1289/ehp.7167
- Yah, C. S., Simate, G. S., and Iyuke, S. E. (2012). Nanoparticles Toxicity and Their Routes of Exposures. *Pak J. Pharm. Sci.* 25, 477–491.
- Zanchi, N. E., and Lancha, A. H. (2008). Mechanical Stimuli of Skeletal Muscle: Implications on mTOR/p70s6k and Protein Synthesis. *Eur. J. Appl. Physiol.* 102, 253–263. doi:10.1007/s00421-007-0588-3

Conflict of Interest: EC-O and EC-P was employed by the BiowAir Total Systems SL.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Antuña, Carlos Bermejo-Millo, Caso-Onzain, Caso-Peláez, Potes and Coto-Montes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**INFORME SOBRE EMISIÓN DE ANIONES
BIODISPONIBLES PARA ESTUDIO EN
LINFOCITOS PERIFÉRICOS CON UNIDAD DE
REGENERACIÓN CELULAR Y DESCANSO
BIOW 60 Y EL INDIVIDUAL BIOW SPACE**



Índice

1. OBJETO DEL ESTUDIO	3
2. METODOLOGÍA EMPLEADA	3
2.1 MEDICIÓN DE IONES	4
3. RESULTADOS ANALÍTICOS	5
3.1. MEDICIÓN DE IONES	5
3.1.1 MEDICIONES SIN BIOW	5
3.1.2 MEDICIONES CON BIOW 60 EN EL INDIVIDUAL BIOW SPACE	9
4. CONCLUSIONES	19

1. OBJETO DEL ESTUDIO

La finalidad de este estudio es comprobar que la unidad de regeneración y descanso celular BLOW 60 y la cámara Individual Biow Space, es capaz de generar la emisión de aniones biodisponibles para estudio en linfocitos periféricos.

Para la realización de este estudio se hicieron mediciones de iones, antes y después de la instalación de la unidad BLOW 60 y la cámara Individual Biow Space a diferentes distancias.

2. METODOLOGÍA EMPLEADA

Las pruebas se realizaron en la Sala de Ensayos 3 de Climastar, situada en Km 7 AS-266, 33192, Asturias. La sala tiene unas dimensiones de 16,88 m² y tiene una altura de 2,40 m. Está diseñada de manera que el suelo está dividido en cuadrículas de 30x30, de tal manera que se puedan realizar las mediciones a diferentes medidas con gran precisión.

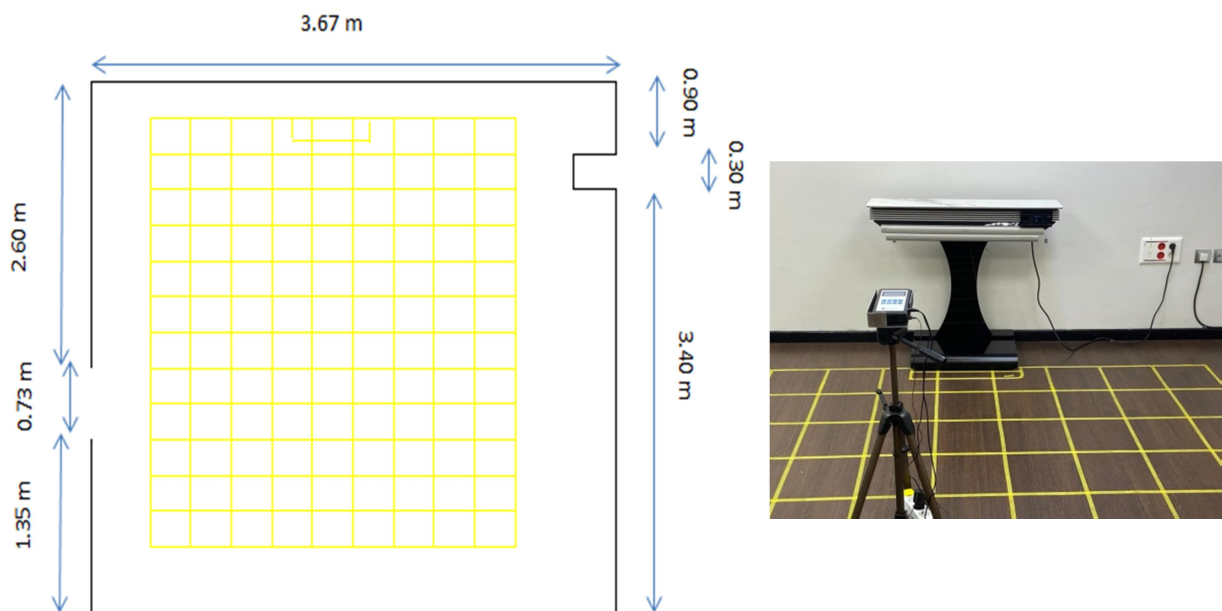


Imagen 1: Sala de ensayos 3 - Climastar

Para la realización de este estudio se realizaron las siguientes mediciones:

- Medición de iones en la sala.

2.1 MEDICIÓN DE IONES

Para la medición de los iones se utilizó el equipo “Air Ion Counter Model AIC 2” de la marca AlphaLab INC. Este equipo mide el número de iones negativos y positivos en el aire.



Imagen 2: Medidor de Iones

3. RESULTADOS ANALÍTICOS

La toma de muestras fue realizada el día 5/11/2021.

Para la realización de los ensayos se situó el medidor de iones a tres distancias (proximal, media y distal) de del equipo Biow 60 y a la altura de la camilla.

A continuación se representan los resultados correspondientes a las mediciones realizadas antes y después de la instalación del equipo Biow 60 y la cámara Individual Biow Space a diferentes distancias del equipo.

3.1. MEDICIÓN DE IONES

Los resultados obtenidos en los muestreos ambientales realizados en la Sala de ensayos fueron los siguientes:

3.1.1 MEDICIONES SIN BIOW

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:00.0	-1.12
00:01.0	-2.49
00:02.0	-2.02
00:03.0	-1.87
00:04.0	-1.87
00:05.0	-1.86
00:06.0	-2.09
00:07.0	-2.03
00:08.0	-2.12
00:09.0	-2.34
00:10.0	-1.99
00:11.0	-1.81
00:12.0	-1.75
00:13.0	-1.9
00:14.0	-2.25
00:15.0	-2.22
00:16.0	-2.22
00:17.0	-2.21
00:18.0	-2.2

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:19.0	-2.11
00:20.0	-2.53
00:21.0	-2.75
00:22.0	-2.68
00:23.0	-2.51
00:24.0	-2.49
00:25.0	-2.58
00:26.0	-2.85
00:27.0	-3.11
00:28.0	-2.99
00:29.0	-2.71
00:30.0	-2.61
00:31.0	-2.66
00:32.0	-2.69
00:33.0	-2.77
00:34.0	-2.87
00:35.0	-2.72
00:36.0	-2.39
00:37.0	-2.45

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:38.0	-2.42
00:39.0	-2.45
00:40.0	-2.36
00:41.0	-2.26
00:42.0	-2.19
00:43.0	-2.23
00:44.0	-2.44
00:45.0	-2.32
00:46.0	-2.38
00:47.0	-2.39
00:48.0	-2.17
00:49.0	-1.93
00:50.0	-2.01
00:51.0	-2.72
00:52.0	-2.46
00:53.0	-2.06
00:54.0	-2.03
00:55.0	-1.96
00:56.0	-1.82
00:57.0	-1.78
00:58.0	-2.06
00:59.0	-2.22
01:00.0	-2.38
01:01.0	-2.07
01:02.0	-1.86
01:03.0	-1.88
01:04.0	-1.95
01:05.0	-1.89
01:06.0	-1.97
01:07.0	-2.18
01:08.0	-2.16
01:09.0	-1.92
01:10.0	-1.99
01:11.0	-1.85
01:12.0	-2.05
01:13.0	-2.08
01:14.0	-2.07
01:15.0	-2.22
01:16.0	-2.52
01:17.0	-2.29
01:18.0	-1.96

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:19.0	-2.17
01:20.0	-2.23
01:21.0	-2.1
01:22.0	-2.04
01:23.0	-2.1
01:24.0	-2.03
01:25.0	-1.86
01:26.0	-1.9
01:27.0	-2.03
01:28.0	-2.04
01:29.0	-2.16
01:30.0	-2.55
01:31.0	-2.35
01:32.0	-2.34
01:33.0	-2.36
01:34.0	-2.3
01:35.0	-1.77
01:36.0	-1.66
01:37.0	-1.79
01:38.0	-1.62
01:39.0	-1.35
01:40.0	-1.23
01:41.0	-0.99
01:42.0	-0.86
01:43.0	-0.82
01:44.0	-0.88
01:45.0	-1.1
01:46.0	-1
01:47.0	-1.09
01:48.0	-1.11
01:49.0	-1.04
01:50.0	-1.09
01:51.0	-1.5
01:52.0	-1.56
01:53.0	-1.62
01:54.0	-1.61
01:55.0	-1.41
01:56.0	-1.1
01:57.0	-1.26
01:58.0	-1.22
01:59.0	-0.93

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:00.0	-0.86
02:01.0	-0.94
02:02.0	-0.84
02:03.0	-0.9
02:04.0	-0.99
02:05.0	-1.04
02:06.0	-1.08
02:07.0	-0.94
02:08.0	-0.99
02:09.0	-1.02
02:10.0	-1.23
02:11.0	-1.38
02:12.0	-1.35
02:13.0	-1.5
02:14.0	-1.29
02:15.0	-1.67
02:16.0	-1.56
02:17.0	-1.67
02:18.0	-1.48
02:19.0	-1.24
02:20.0	-1.13
02:21.0	-1.13
02:22.0	-1.03
02:23.0	-1.03
02:24.0	-1.25
02:25.0	-1.24
02:26.0	-1.15
02:27.0	-1.25
02:28.0	-1.17
02:29.0	-1.23
02:30.0	-1.38
02:31.0	-1.4
02:32.0	-1.35
02:33.0	-1.35
02:34.0	-1.23
02:35.0	-1.17
02:36.0	-1.08
02:37.0	-0.79
02:38.0	-0.64
02:39.0	-0.65
02:40.0	-0.86

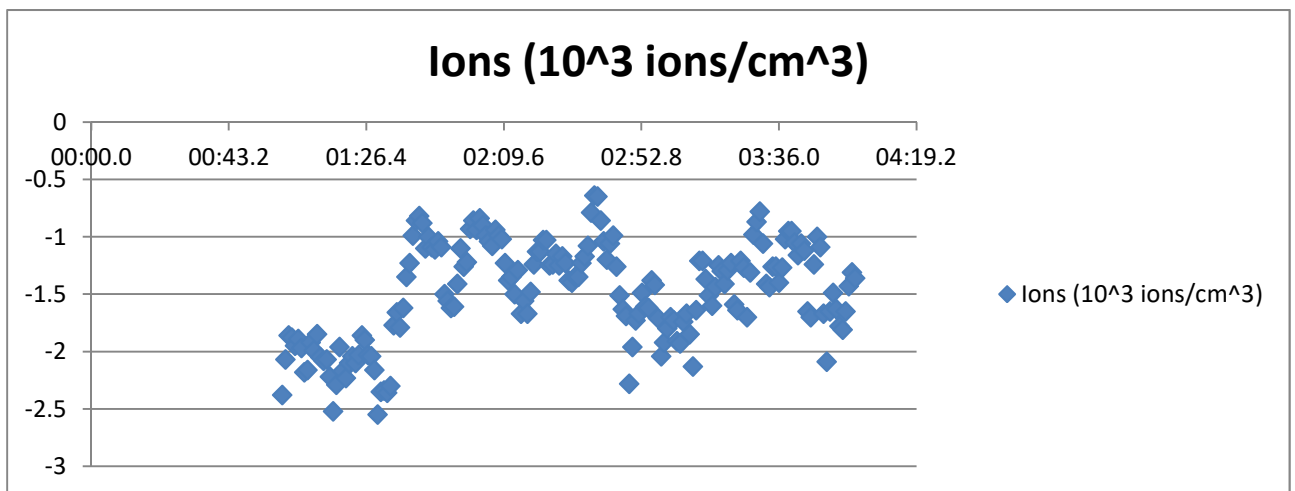
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:41.0	-1.04
02:42.0	-1.2
02:43.0	-1.06
02:44.0	-0.99
02:45.0	-1.26
02:46.0	-1.51
02:47.0	-1.63
02:48.0	-1.69
02:49.0	-2.28
02:50.0	-1.96
02:51.0	-1.73
02:52.0	-1.67
02:53.0	-1.49
02:54.0	-1.61
02:55.0	-1.62
02:56.0	-1.38
02:57.0	-1.42
02:58.0	-1.71
02:59.0	-2.04
03:00.0	-1.92
03:01.0	-1.8
03:02.0	-1.7
03:03.0	-1.73
03:04.0	-1.91
03:05.0	-1.93
03:06.0	-1.74
03:07.0	-1.67
03:08.0	-1.85
03:09.0	-2.13
03:10.0	-1.64
03:11.0	-1.21
03:12.0	-1.21
03:13.0	-1.37
03:14.0	-1.51
03:15.0	-1.6
03:16.0	-1.44
03:17.0	-1.25
03:18.0	-1.3
03:19.0	-1.41
03:20.0	-1.29
03:21.0	-1.23

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:22.0	-1.59
03:23.0	-1.64
03:24.0	-1.21
03:25.0	-1.27
03:26.0	-1.7
03:27.0	-1.31
03:28.0	-0.98
03:29.0	-0.87
03:30.0	-0.78
03:31.0	-1.06
03:32.0	-1.41
03:33.0	-1.44
03:34.0	-1.26
03:35.0	-1.26
03:36.0	-1.4
03:37.0	-1.27
03:38.0	-1.02
03:39.0	-0.95
03:40.0	-0.95
03:41.0	-1.05
03:42.0	-1.16
03:43.0	-1.06
03:44.0	-1.12
03:45.0	-1.65
03:46.0	-1.7
03:47.0	-1.24
03:48.0	-1
03:49.0	-1.09
03:50.0	-1.67
03:51.0	-2.09
03:52.0	-1.65
03:53.0	-1.49
03:54.0	-1.63
03:55.0	-1.78
03:56.0	-1.81
03:57.0	-1.65
03:58.0	-1.43
03:59.0	-1.31
04:00.0	-1.36
04:01.0	-1.46
04:02.0	-1.73

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
04:03.0	-1.82
04:04.0	-1.87
04:05.0	-1.78
04:06.0	-1.5
04:07.0	-1.46
04:08.0	-1.58
04:09.0	-1.78
04:10.0	-1.65
04:11.0	-1.64
04:12.0	-1.68
04:13.0	-1.86
04:14.0	-1.87
04:15.0	-1.79
04:16.0	-1.97
04:17.0	-2.19
04:18.0	-2.25
04:19.0	-2.43
04:20.0	-2.67

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos , eliminando los resultados del primer minuto. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-1.49
MODA	-1.23
MINIMO	-0.64
MÁXIMO	-2.55



3.1.2 MEDICIONES CON BIOW 60 EN EL INDIVIDUAL BIOW SPACE

Estas mediciones se realizaron también en la Sala de Ensayos 3 de Climastar. Para la realización de los mismos se utilizó el INDIVIDUAL BIOW SPACE y el equipo BIOW 60, realizando la medición de los iones en tres zonas: la más próxima al equipo, en una zona intermedia y en la zona más alejada del equipo.



Imagen 4 y 5: INDIVIDUAL BIOW SPACE

A) VELOCIDAD V3 – ZONA PIES CABEZA

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:00.0	-1626.9
00:01.0	-1669.67
00:02.0	-1731.61
00:03.0	-1675.75
00:04.0	-1723.77
00:05.0	-1840.5
00:06.0	-1879.22
00:08.0	-1938.75
00:09.0	-1888.62
00:11.0	-1996.45
00:12.0	-1841.83
00:13.0	-1706.33
00:14.0	-1944.39
00:16.0	-1915.14
00:17.0	-1791.28
00:18.0	-1837.79
00:19.0	-1950.56
00:20.0	-1908.01
00:21.0	-1803.27
00:22.0	-1928.72
00:24.0	-1824.15
00:25.0	-1790.09
00:27.0	-1966.51
00:28.0	-1926.97
00:29.0	-1824.12
00:30.0	-1935.37
00:34.0	-1980.78
00:35.0	-1889.73
00:36.0	-1892.92
00:41.0	-1973.35
00:42.0	-1948.55
00:43.0	-1962.45
00:44.0	-1937.05
00:45.0	-1961.2
00:46.0	-1938.8
00:47.0	-1808.19
00:48.0	-1967.2

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:49.0	-1910.83
00:50.0	-1901.47
00:51.0	-1933.87
00:52.0	-1997.33
00:53.0	-1965.31
00:54.0	-1916.66
00:55.0	-1975.58
00:56.0	-1979.31
00:59.0	-1963.2
01:02.0	-1931.25
01:03.0	-1790.26
01:04.0	-1768.92
01:05.0	-1798.13
01:06.0	-1837.82
01:07.0	-1952.46
01:08.0	-1889.12
01:09.0	-1924.31
01:10.0	-1921.38
01:11.0	-1878.42
01:12.0	-1968.39
01:16.0	-1906.7
01:17.0	-1760.26
01:18.0	-1985.89
01:21.0	-1765.7
01:22.0	-1628.19
01:23.0	-1439.51
01:24.0	-1344.72
01:25.0	-1125.84
01:26.0	-990.22
01:27.0	-1190.93
01:28.0	-1225.93
01:29.0	-1224.91
01:30.0	-1492.06
01:31.0	-1460.5
01:32.0	-1457.86
01:33.0	-1620.35
01:34.0	-1467.98

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:35.0	-1305.74
01:36.0	-1412.53
01:37.0	-1478.16
01:38.0	-1381
01:39.0	-1280.18
01:40.0	-1333.84
01:41.0	-1333.48
01:42.0	-1138.14
01:43.0	-1331.84
01:44.0	-1532.66
01:45.0	-1543.22
01:46.0	-1387.54
01:47.0	-1271.56
01:48.0	-1338.92
01:49.0	-1419.95
01:50.0	-1538.2
01:51.0	-1569.81
01:52.0	-1341.14
01:53.0	-1360.43
01:54.0	-1417.57
01:55.0	-1431.51
01:56.0	-1422.97
01:57.0	-1354.06
01:58.0	-1281.21
01:59.0	-1236.86
02:00.0	-1389.91
02:01.0	-1401.79
02:02.0	-1543.25
02:03.0	-1460.78
02:04.0	-1296.1
02:05.0	-1496.4
02:06.0	-1545.11
02:07.0	-1466.09
02:08.0	-1350.32
02:09.0	-1404.39
02:10.0	-1449.52
02:11.0	-1429.52
02:12.0	-1461.31
02:13.0	-1509.36
02:14.0	-1406.91
02:15.0	-1388.17

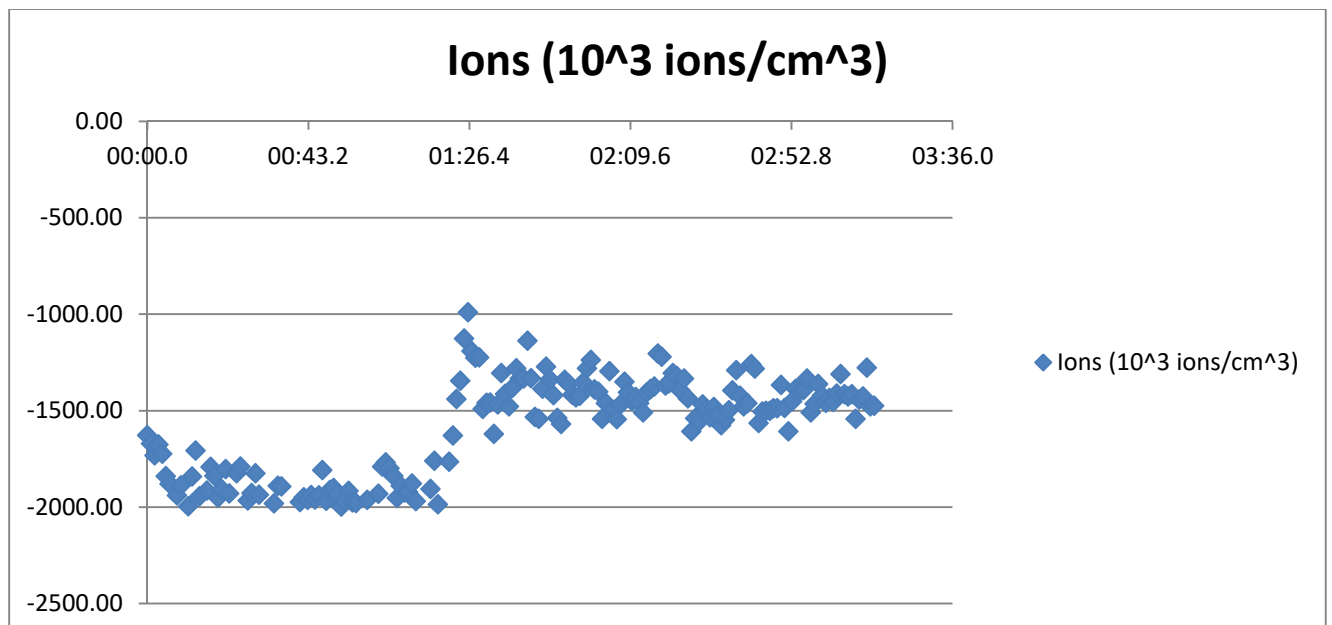
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:16.0	-1374.65
02:17.0	-1204.06
02:18.0	-1220.78
02:19.0	-1369.69
02:20.0	-1358.77
02:21.0	-1304.71
02:22.0	-1320.55
02:23.0	-1392.64
02:24.0	-1333.51
02:25.0	-1436.21
02:26.0	-1608.01
02:27.0	-1539.53
02:28.0	-1556.7
02:29.0	-1468.04
02:30.0	-1489.26
02:31.0	-1533.81
02:32.0	-1481.61
02:33.0	-1524.24
02:34.0	-1576.4
02:35.0	-1548.16
02:36.0	-1497.38
02:37.0	-1395.1
02:38.0	-1291.06
02:39.0	-1422.55
02:40.0	-1477.33
02:41.0	-1461.09
02:42.0	-1258.71
02:43.0	-1282.18
02:44.0	-1563.6
02:45.0	-1503.8
02:46.0	-1501.09
02:47.0	-1501.92
02:48.0	-1487.32
02:49.0	-1488.17
02:50.0	-1367.6
02:51.0	-1485.54
02:52.0	-1607.18
02:53.0	-1451.01
02:54.0	-1386.57
02:55.0	-1398.5
02:56.0	-1393.5

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
02:57.0	-1333.85
02:58.0	-1509.51
02:59.0	-1465.01
03:00.0	-1361.87
03:01.0	-1422.38
03:02.0	-1460.17
03:03.0	-1434.64
03:04.0	-1454.65
03:05.0	-1412.47
03:06.0	-1309.7

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
03:07.0	-1414.85
03:08.0	-1426.29
03:09.0	-1414.87
03:10.0	-1543.06
03:11.0	-1443.73
03:12.0	-1426.62
03:13.0	-1277.17
03:14.0	-1478.45
03:15.0	-1473.97

A continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo.

MEDIA	-1575.91
MODA	∅
MÍNIMO	-990.22
MÁXIMO	-1997.33



B) VELOCIDAD V3 – ZONA INTERMEDIA

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:00.0	-52.44
00:01.0	-111.53
00:02.0	-126.66
00:03.0	-134.88
00:04.0	-108.86
00:05.0	-130.46
00:06.0	-115.23
00:07.0	-103.38
00:08.0	-92.68
00:09.0	-109.14
00:10.0	-108.64
00:11.0	-111.36
00:12.0	-118.41
00:13.0	-133.2
00:14.0	-108.37
00:15.0	-77.62
00:16.0	-109.94
00:17.0	-120.5
00:18.0	-100.51
00:19.0	-117.59
00:20.0	-118.12
00:21.0	-119.7
00:22.0	-133.07
00:23.0	-76.93
00:24.0	-79.27
00:25.0	-99.2
00:26.0	-110.99
00:27.0	-133.1
00:28.0	-150.06
00:29.0	-128.6
00:30.0	-104.01
00:31.0	-119.94
00:32.0	-131.86
00:33.0	-130.31
00:34.0	-161.34
00:35.0	-167.91
00:36.0	-136.77
00:37.0	-115.83
00:38.0	-128.67

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:39.0	-139.45
00:40.0	-125.99
00:41.0	-123.98
00:42.0	-129.22
00:43.0	-137.78
00:44.0	-130.64
00:45.0	-139.51
00:46.0	-133.1
00:47.0	-154.2
00:48.0	-145.2
00:49.0	-117.83
00:50.0	-162.53
00:51.0	-160.03
00:52.0	-130.2
00:53.0	-127.64
00:54.0	-126.12
00:55.0	-123.07
00:56.0	-148.75
00:57.0	-130.02
00:58.0	-122.09
00:59.0	-135.32
01:00.0	-148.52
01:01.0	-156.15
01:02.0	-149.98
01:03.0	-127.19
01:04.0	-110.95
01:05.0	-120.75
01:06.0	-138.91
01:07.0	-161.87
01:08.0	-139.96
01:09.0	-147.98
01:10.0	-166.94
01:11.0	-129.62
01:12.0	-107.22
01:13.0	-116.66
01:14.0	-131.93
01:15.0	-111.92
01:16.0	-101.44
01:17.0	-128.94

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:18.0	-154.05
01:19.0	-129.49
01:20.0	-69.45
01:21.0	-60.84
01:22.0	-115.7
01:23.0	-82.78
01:24.0	-83.48
01:25.0	-74.6
01:26.0	-65.1
01:27.0	-100.67
01:28.0	-126.22
01:29.0	-81.79
01:30.0	-89.41
01:31.0	-123.06
01:32.0	-148.88
01:33.0	-138.32
01:34.0	-128.1
01:35.0	-123.06
01:36.0	-121.99
01:37.0	-123.93
01:38.0	-122.23
01:39.0	-148.54
01:40.0	-164.47
01:41.0	-159.07
01:42.0	-153.73
01:43.0	-123.88
01:44.0	-176.43
01:45.0	-173.37
01:46.0	-161.98
01:47.0	-144.54
01:48.0	-144.05
01:49.0	-154.67
01:50.0	-142.64
01:51.0	-146.49
01:52.0	-118.33
01:53.0	-147.83
01:54.0	-151.18
01:55.0	-136.38
01:56.0	-143.78
01:57.0	-143.08
01:58.0	-132.5

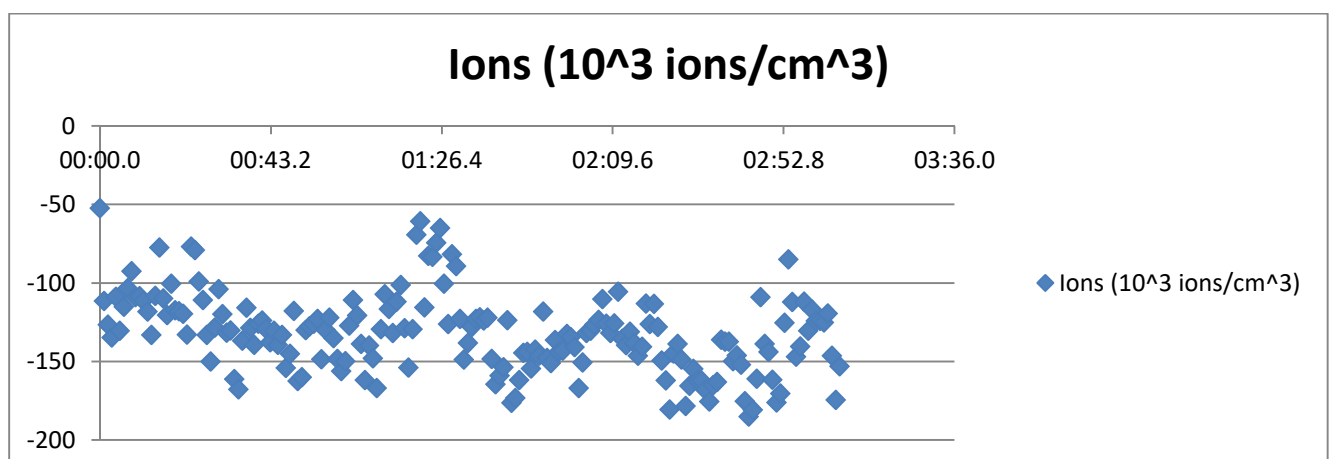
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:59.0	-134.64
02:00.0	-140.9
02:01.0	-167.05
02:02.0	-150.7
02:03.0	-131.89
02:04.0	-130.51
02:05.0	-126.59
02:06.0	-123.68
02:07.0	-110.4
02:08.0	-126.08
02:09.0	-131.99
02:10.0	-125.86
02:11.0	-105.65
02:12.0	-135.7
02:13.0	-139.7
02:14.0	-131.21
02:15.0	-138.24
02:16.0	-146.51
02:17.0	-140.8
02:18.0	-113.16
02:19.0	-126.29
02:20.0	-113.53
02:21.0	-128.08
02:22.0	-149.52
02:23.0	-162.12
02:24.0	-180.68
02:25.0	-145.1
02:26.0	-138.93
02:27.0	-148.81
02:28.0	-178.32
02:29.0	-165.64
02:30.0	-154.73
02:31.0	-162.14
02:32.0	-162.19
02:33.0	-167.98
02:34.0	-175.5
02:35.0	-165.15
02:36.0	-163.06
02:37.0	-136.25
02:38.0	-137.41
02:39.0	-137.4

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
02:40.0	-149.81
02:41.0	-146.2
02:42.0	-152.07
02:43.0	-175.4
02:44.0	-185.22
02:45.0	-180.86
02:46.0	-161
02:47.0	-109.22
02:48.0	-138.93
02:49.0	-143.94
02:50.0	-161.75
02:51.0	-176.1
02:52.0	-170.46
02:53.0	-125.35

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
02:54.0	-85.19
02:55.0	-112.23
02:56.0	-147.11
02:57.0	-140.48
02:58.0	-111.94
02:59.0	-130.59
03:00.0	-117.12
03:01.0	-124.25
03:02.0	-124.26
03:03.0	-125.19
03:04.0	-119.49
03:05.0	-146.42
03:06.0	-174.44
03:07.0	-153.22

A continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo.

MEDIA	-132.15
MODA	-133.1
MÍNIMO	-52.44
MÁXIMO	-185.22



C) VELOCIDAD V3 – ZONA ALEJADA

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:00.0	-73.99
00:01.0	-75.37
00:02.0	-76.84
00:03.0	-72.72
00:04.0	-79.04
00:05.0	-78.35
00:06.0	-73.02
00:07.0	-61.98
00:08.0	-64.08
00:09.0	-68.36
00:10.0	-71.23
00:11.0	-71.37
00:12.0	-57.77
00:13.0	-54.19
00:14.0	-70.47
00:15.0	-81.32
00:16.0	-71.23
00:17.0	-76.59
00:18.0	-80.52
00:19.0	-76.52
00:20.0	-73.96
00:21.0	-79.39
00:22.0	-76.75
00:23.0	-73.11
00:24.0	-73.47
00:25.0	-81.4
00:26.0	-67.51
00:27.0	-69.91
00:28.0	-75.94
00:29.0	-82.2
00:30.0	-69.09
00:31.0	-62.05
00:32.0	-75.15
00:33.0	-75.54
00:34.0	-73.38
00:35.0	-85.07
00:36.0	-85.94
00:37.0	-73.87

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:38.0	-71.07
00:39.0	-84.6
00:40.0	-85.13
00:41.0	-67.58
00:42.0	-60.97
00:43.0	-66.51
00:44.0	-74.14
00:45.0	-70.44
00:46.0	-73.48
00:47.0	-87.62
00:48.0	-84.7
00:49.0	-74.7
00:50.0	-71.01
00:51.0	-78.58
00:52.0	-78.87
00:53.0	-71.19
00:54.0	-78.84
00:55.0	-76.49
00:56.0	-64.25
00:57.0	-70.63
00:58.0	-70.03
00:59.0	-73.96
01:00.0	-79.24
01:01.0	-80.79
01:02.0	-82.13
01:03.0	-80.14
01:04.0	-81.07
01:05.0	-74.86
01:06.0	-76.07
01:07.0	-80.11
01:08.0	-76.68
01:09.0	-79.72
01:10.0	-81.35
01:11.0	-86.99
01:12.0	-88.5
01:13.0	-87.22
01:14.0	-86.37
01:15.0	-89.95
01:16.0	-79.51

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:17.0	-72.04
01:18.0	-68.75
01:19.0	-61.28
01:20.0	-75.11
01:21.0	-80.43
01:22.0	-78.37
01:23.0	-71.15
01:24.0	-72.07
01:25.0	-76.25
01:26.0	-81.24
01:27.0	-81.32
01:28.0	-74.56
01:29.0	-74.75
01:30.0	-80
01:31.0	-81.43
01:32.0	-93.25
01:33.0	-98.97
01:34.0	-100.77
01:35.0	-90.72
01:36.0	-82.43
01:37.0	-84.39
01:38.0	-77.43
01:39.0	-81.72
01:40.0	-89.81
01:41.0	-87.44
01:42.0	-84.56
01:43.0	-79.98
01:44.0	-83.78
01:45.0	-83.65
01:46.0	-88.77
01:47.0	-88.39
01:48.0	-83.97
01:49.0	-74.51
01:50.0	-76.59
01:51.0	-78.61
01:52.0	-91.14
01:53.0	-99.1
01:54.0	-95.96
01:55.0	-88.51
01:56.0	-81.95
01:57.0	-76.01

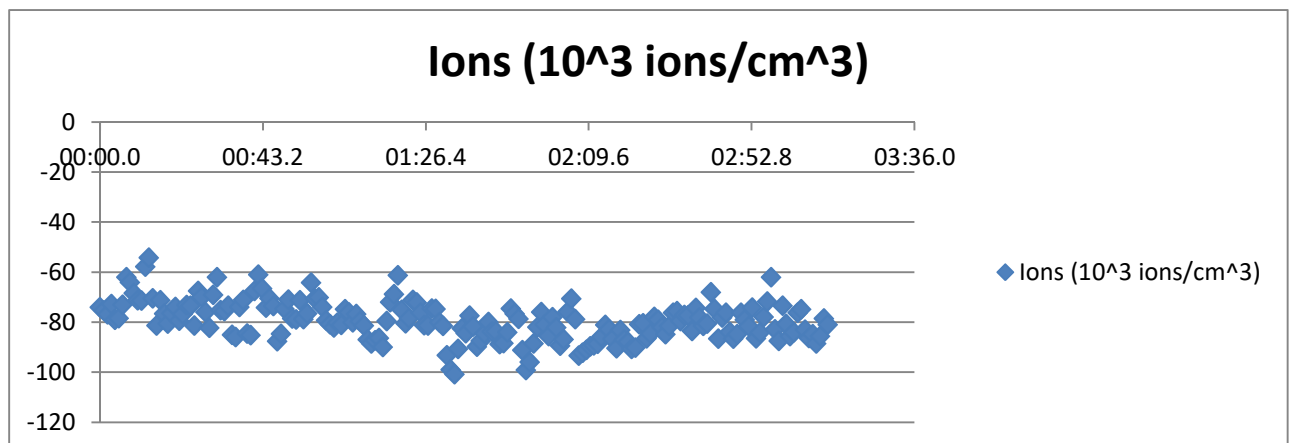
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:58.0	-80.96
01:59.0	-85.61
02:00.0	-77.97
02:01.0	-82.16
02:02.0	-89.35
02:03.0	-86.89
02:04.0	-75.82
02:05.0	-70.64
02:06.0	-78.78
02:07.0	-93.37
02:08.0	-92.27
02:09.0	-91.05
02:10.0	-89.69
02:11.0	-89.26
02:12.0	-88.66
02:13.0	-85.79
02:14.0	-81.04
02:15.0	-82.82
02:16.0	-86.73
02:17.0	-90.46
02:18.0	-83.17
02:19.0	-86.97
02:20.0	-87.84
02:21.0	-90.69
02:22.0	-90.22
02:23.0	-80.87
02:24.0	-80.4
02:25.0	-86.44
02:26.0	-84.57
02:27.0	-77.94
02:28.0	-79.01
02:29.0	-81.92
02:30.0	-84.79
02:31.0	-81.41
02:32.0	-76.25
02:33.0	-75.64
02:34.0	-79.51
02:35.0	-77.17
02:36.0	-77.19
02:37.0	-83.52
02:38.0	-74.26

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
02:39.0	-78.11
02:40.0	-81.42
02:41.0	-80.6
02:42.0	-68
02:43.0	-74.68
02:44.0	-86.56
02:45.0	-78.2
02:46.0	-76.21
02:47.0	-83.86
02:48.0	-86.54
02:49.0	-84.75
02:50.0	-76.22
02:51.0	-79.08
02:52.0	-81.57
02:53.0	-74.14
02:54.0	-86.43
02:55.0	-84.11
02:56.0	-77.88

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
02:57.0	-71.77
02:58.0	-62.04
02:59.0	-82.81
03:00.0	-87.45
03:01.0	-73.41
03:02.0	-80.75
03:03.0	-85.54
03:04.0	-84.06
03:05.0	-76.23
03:06.0	-74.79
03:07.0	-83
03:08.0	-86.3
03:09.0	-84.75
03:10.0	-88.53
03:11.0	-85.57
03:12.0	-78.56
03:13.0	-80.9

A continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo.

MEDIA	-79.43
MODA	-71.23
MÍNIMO	-54.19
MÁXIMO	-100.77

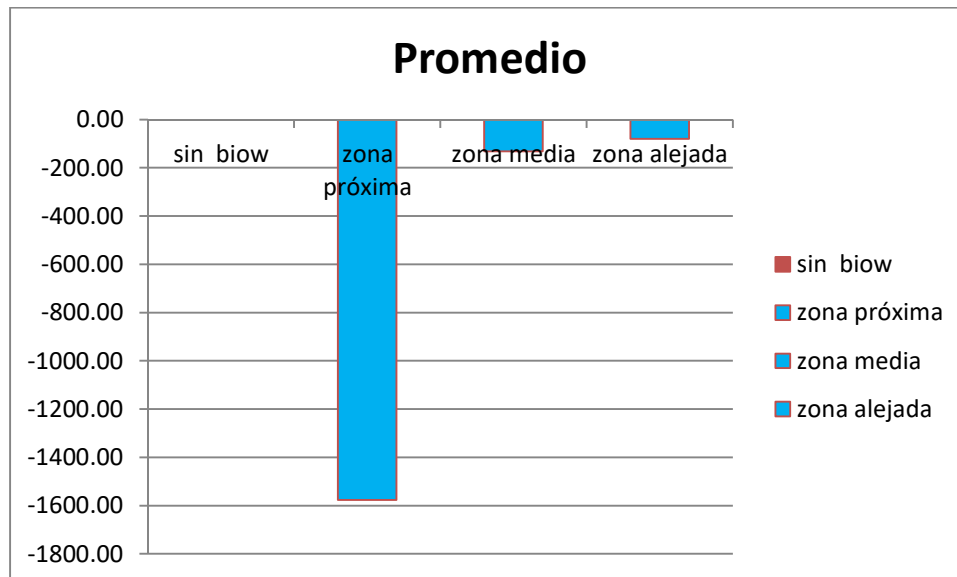


4. CONCLUSIONES

Si analizamos los datos obtenidos de los muestreos realizados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

De las mediciones realizadas se puede deducir que el uso de la unidad BLOW 60 a máxima velocidad junto con la cámara Individual Biow Space provoca un alto incremento del número de iones negativos en el ambiente. Este incremento es mayor a medida que nos aproximamos al equipo,

		BIOW 60 + INDIVIDUAL BIOW SPACE			
		sin biow	zona próxima	zona media	zona alejada
Promedio		-1.49	-1575.91	-132.15	-79.43





Fdo. Pablo Jalón Monzón

Técnico Analiza Calidad

Informe emitido el 30/11/2021

**INFORME SOBRE EMISIÓN DE ANIONES
BIODISPONIBLES PARA ESTUDIO EN
LINFOCITOS PERIFÉRICOS CON UNIDAD DE
REGENERACIÓN CELULAR Y DESCANSO
BIOW 60**



Índice

1. OBJETO DEL ESTUDIO	3
2. METODOLOGÍA EMPLEADA	3
2.1 MEDICIÓN DE IONES	4
3. RESULTADOS ANALÍTICOS	5
3.1. MEDICIÓN DE IONES	5
3.1.1 MEDICIONES SIN BIOW	5
3.1.2 MEDICIONES CON BIOW 60	9
4. CONCLUSIONES	23

1. OBJETO DEL ESTUDIO

La finalidad de este estudio es comprobar que la unidad de regeneración y descanso celular BLOW 60, es capaz de generar la emisión de aniones biodisponibles para estudio en linfocitos periféricos.

Para la realización de este estudio se hicieron mediciones de iones, antes y después de la instalación de la unidad BLOW a diferentes velocidades de funcionamiento.

2. METODOLOGÍA EMPLEADA

Las pruebas se realizaron en la Sala de Ensayos 3 de Climastar, situada en Km 7 AS-266, 33192, Asturias. La sala tiene unas dimensiones de 16,88 m² y tiene una altura de 2,40 m. Está diseñada de manera que el suelo está dividido en cuadrículas de 30x30, de tal manera que se puedan realizar las mediciones a diferentes medidas con gran precisión.

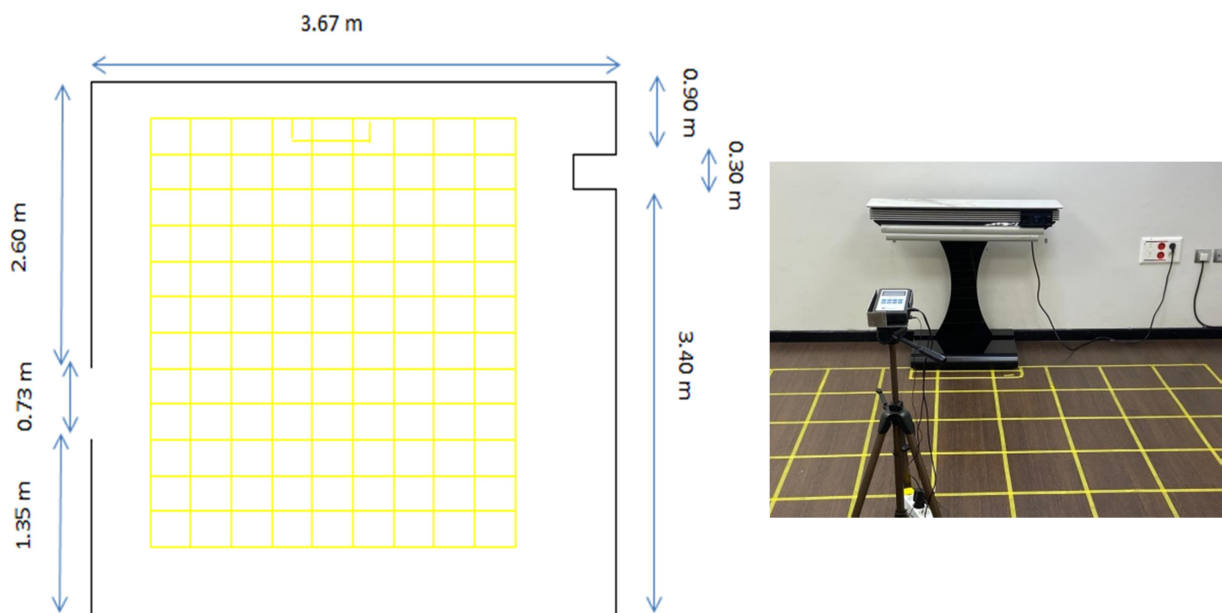


Imagen 1: Sala de ensayos 3 - Climastar

Para la realización de este estudio se realizaron las siguientes mediciones:

- Medición de iones en la sala.

2.1 MEDICIÓN DE IONES

Para la medición de los iones se utilizó el equipo “Air Ion Counter Model AIC 2” de la marca AlphaLab INC. Este equipo mide el número de iones negativos y positivos en el aire.



Imagen 2: Medidor de Iones

3. RESULTADOS ANALÍTICOS

La toma de muestras fue realizada el día 5/11/2021.

Para la realización de los ensayos se situó el medidor de iones a una distancia de 1,30 m del equipo Biow 60 y a 90 cm del suelo.

A continuación se representan los resultados correspondientes a las mediciones realizadas antes y después de la instalación del equipo Biow 60 a diferentes velocidades de funcionamiento del equipo.

3.1. MEDICIÓN DE IONES

Los resultados obtenidos en los muestreos ambientales realizados en la Sala de ensayos fueron los siguientes:

3.1.1 MEDICIONES SIN BIOW

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:00.0	-1.12
00:01.0	-2.49
00:02.0	-2.02
00:03.0	-1.87
00:04.0	-1.87
00:05.0	-1.86
00:06.0	-2.09
00:07.0	-2.03
00:08.0	-2.12
00:09.0	-2.34
00:10.0	-1.99
00:11.0	-1.81
00:12.0	-1.75
00:13.0	-1.9
00:14.0	-2.25
00:15.0	-2.22
00:16.0	-2.22
00:17.0	-2.21
00:18.0	-2.2
00:19.0	-2.11
00:20.0	-2.53
00:21.0	-2.75

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:22.0	-2.68
00:23.0	-2.51
00:24.0	-2.49
00:25.0	-2.58
00:26.0	-2.85
00:27.0	-3.11
00:28.0	-2.99
00:29.0	-2.71
00:30.0	-2.61
00:31.0	-2.66
00:32.0	-2.69
00:33.0	-2.77
00:34.0	-2.87
00:35.0	-2.72
00:36.0	-2.39
00:37.0	-2.45
00:38.0	-2.42
00:39.0	-2.45
00:40.0	-2.36
00:41.0	-2.26
00:42.0	-2.19
00:43.0	-2.23

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:44.0	-2.44
00:45.0	-2.32
00:46.0	-2.38
00:47.0	-2.39
00:48.0	-2.17
00:49.0	-1.93
00:50.0	-2.01
00:51.0	-2.72
00:52.0	-2.46
00:53.0	-2.06
00:54.0	-2.03
00:55.0	-1.96
00:56.0	-1.82
00:57.0	-1.78
00:58.0	-2.06
00:59.0	-2.22
01:00.0	-2.38
01:01.0	-2.07
01:02.0	-1.86
01:03.0	-1.88
01:04.0	-1.95
01:05.0	-1.89
01:06.0	-1.97
01:07.0	-2.18
01:08.0	-2.16
01:09.0	-1.92
01:10.0	-1.99
01:11.0	-1.85
01:12.0	-2.05
01:13.0	-2.08
01:14.0	-2.07
01:15.0	-2.22
01:16.0	-2.52
01:17.0	-2.29
01:18.0	-1.96
01:19.0	-2.17
01:20.0	-2.23
01:21.0	-2.1
01:22.0	-2.04
01:23.0	-2.1
01:24.0	-2.03

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:25.0	-1.86
01:26.0	-1.9
01:27.0	-2.03
01:28.0	-2.04
01:29.0	-2.16
01:30.0	-2.55
01:31.0	-2.35
01:32.0	-2.34
01:33.0	-2.36
01:34.0	-2.3
01:35.0	-1.77
01:36.0	-1.66
01:37.0	-1.79
01:38.0	-1.62
01:39.0	-1.35
01:40.0	-1.23
01:41.0	-0.99
01:42.0	-0.86
01:43.0	-0.82
01:44.0	-0.88
01:45.0	-1.1
01:46.0	-1
01:47.0	-1.09
01:48.0	-1.11
01:49.0	-1.04
01:50.0	-1.09
01:51.0	-1.5
01:52.0	-1.56
01:53.0	-1.62
01:54.0	-1.61
01:55.0	-1.41
01:56.0	-1.1
01:57.0	-1.26
01:58.0	-1.22
01:59.0	-0.93
02:00.0	-0.86
02:01.0	-0.94
02:02.0	-0.84
02:03.0	-0.9
02:04.0	-0.99
02:05.0	-1.04

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:06.0	-1.08
02:07.0	-0.94
02:08.0	-0.99
02:09.0	-1.02
02:10.0	-1.23
02:11.0	-1.38
02:12.0	-1.35
02:13.0	-1.5
02:14.0	-1.29
02:15.0	-1.67
02:16.0	-1.56
02:17.0	-1.67
02:18.0	-1.48
02:19.0	-1.24
02:20.0	-1.13
02:21.0	-1.13
02:22.0	-1.03
02:23.0	-1.03
02:24.0	-1.25
02:25.0	-1.24
02:26.0	-1.15
02:27.0	-1.25
02:28.0	-1.17
02:29.0	-1.23
02:30.0	-1.38
02:31.0	-1.4
02:32.0	-1.35
02:33.0	-1.35
02:34.0	-1.23
02:35.0	-1.17
02:36.0	-1.08
02:37.0	-0.79
02:38.0	-0.64
02:39.0	-0.65
02:40.0	-0.86
02:41.0	-1.04
02:42.0	-1.2
02:43.0	-1.06
02:44.0	-0.99
02:45.0	-1.26
02:46.0	-1.51

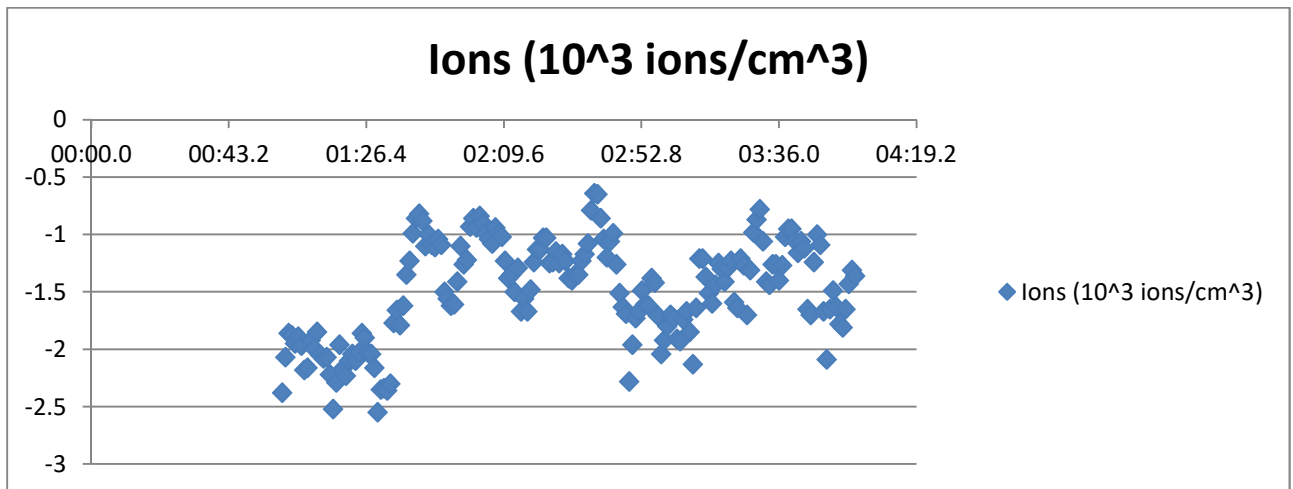
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:47.0	-1.63
02:48.0	-1.69
02:49.0	-2.28
02:50.0	-1.96
02:51.0	-1.73
02:52.0	-1.67
02:53.0	-1.49
02:54.0	-1.61
02:55.0	-1.62
02:56.0	-1.38
02:57.0	-1.42
02:58.0	-1.71
02:59.0	-2.04
03:00.0	-1.92
03:01.0	-1.8
03:02.0	-1.7
03:03.0	-1.73
03:04.0	-1.91
03:05.0	-1.93
03:06.0	-1.74
03:07.0	-1.67
03:08.0	-1.85
03:09.0	-2.13
03:10.0	-1.64
03:11.0	-1.21
03:12.0	-1.21
03:13.0	-1.37
03:14.0	-1.51
03:15.0	-1.6
03:16.0	-1.44
03:17.0	-1.25
03:18.0	-1.3
03:19.0	-1.41
03:20.0	-1.29
03:21.0	-1.23
03:22.0	-1.59
03:23.0	-1.64
03:24.0	-1.21
03:25.0	-1.27
03:26.0	-1.7
03:27.0	-1.31

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:28.0	-0.98
03:29.0	-0.87
03:30.0	-0.78
03:31.0	-1.06
03:32.0	-1.41
03:33.0	-1.44
03:34.0	-1.26
03:35.0	-1.26
03:36.0	-1.4
03:37.0	-1.27
03:38.0	-1.02
03:39.0	-0.95
03:40.0	-0.95
03:41.0	-1.05
03:42.0	-1.16
03:43.0	-1.06
03:44.0	-1.12
03:45.0	-1.65
03:46.0	-1.7
03:47.0	-1.24
03:48.0	-1
03:49.0	-1.09
03:50.0	-1.67
03:51.0	-2.09
03:52.0	-1.65
03:53.0	-1.49
03:54.0	-1.63

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:55.0	-1.78
03:56.0	-1.81
03:57.0	-1.65
03:58.0	-1.43
03:59.0	-1.31
04:00.0	-1.36
04:01.0	-1.46
04:02.0	-1.73
04:03.0	-1.82
04:04.0	-1.87
04:05.0	-1.78
04:06.0	-1.5
04:07.0	-1.46
04:08.0	-1.58
04:09.0	-1.78
04:10.0	-1.65
04:11.0	-1.64
04:12.0	-1.68
04:13.0	-1.86
04:14.0	-1.87
04:15.0	-1.79
04:16.0	-1.97
04:17.0	-2.19
04:18.0	-2.25
04:19.0	-2.43
04:20.0	-2.67

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos , eliminando los resultados del primer minuto. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-1.49
MODA	-1.23
MINIMO	-0.64
MÁXIMO	-2.55



3.1.2 MEDICIONES CON BIOW 60

A) VELOCIDAD V SILENT

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:00.0	-11.8
00:01.0	-21.68
00:02.0	-18.51
00:03.0	-17.58
00:04.0	-22.12
00:05.0	-30.63
00:06.0	-35.44
00:07.0	-32.56
00:08.0	-29.42
00:09.0	-30.43
00:10.0	-35.03
00:11.0	-39.47
00:12.0	-38.07
00:13.0	-36.29
00:14.0	-36.42
00:15.0	-35.1
00:16.0	-32.29
00:17.0	-29.19
00:18.0	-23.91
00:19.0	-18.31
00:20.0	-14.07
00:21.0	-10.49
00:22.0	-11.32

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:23.0	-11.28
00:24.0	-10.69
00:25.0	-10.16
00:26.0	-9.67
00:27.0	-10.32
00:28.0	-10.33
00:29.0	-10.06
00:30.0	-10.59
00:31.0	-11.39
00:32.0	-12.21
00:33.0	-12.43
00:34.0	-11.84
00:35.0	-10.64
00:36.0	-9.96
00:37.0	-8.86
00:38.0	-6.98
00:39.0	-6.16
00:40.0	-5.31
00:41.0	-4.86
00:42.0	-4.9
00:43.0	-5.25
00:44.0	-5.53
00:45.0	-5.68

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:46.0	-5.65
00:47.0	-5.75
00:48.0	-5.6
00:49.0	-4.9
00:50.0	-4.76
00:51.0	-4.91
00:52.0	-5.14
00:53.0	-5.61
00:54.0	-5.93
00:55.0	-6.13
00:56.0	-6.66
00:57.0	-6.66
00:58.0	-6.86
00:59.0	-6.97
01:00.0	-5.84
01:01.0	-5.11
01:02.0	-5.44
01:03.0	-5.69
01:04.0	-5.4
01:05.0	-5.27
01:06.0	-5.47
01:07.0	-5.6
01:08.0	-5.26
01:09.0	-4.96
01:10.0	-5.34
01:11.0	-5.14
01:12.0	-4.83
01:13.0	-4.83
01:14.0	-4.87
01:15.0	-10.55
01:16.0	-5.2
01:17.0	-5.48
01:18.0	-5.6
01:19.0	-5.7
01:20.0	-5.73
01:21.0	-6.37
01:22.0	-6.35
01:23.0	-6.56
01:24.0	-6.69
01:25.0	-6.75
01:26.0	-6.99

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:27.0	-8.35
01:28.0	-8.7
01:29.0	-7.57
01:30.0	-7.91
01:31.0	-7.96
01:32.0	-8
01:33.0	-9.3
01:34.0	-9.52
01:35.0	-9.18
01:36.0	-8.06
01:37.0	-6.96
01:38.0	-5.95
01:39.0	-6.11
01:40.0	-8.01
01:41.0	-9.44
01:42.0	-9.59
01:43.0	-9.03
01:44.0	-8.17
01:45.0	-8.05
01:46.0	-9.57
01:47.0	-12.94
01:48.0	-13.94
01:49.0	-13.26
01:50.0	-13.93
01:51.0	-14.13
01:52.0	-13.11
01:53.0	-12.68
01:54.0	-12.4
01:55.0	-12.8
01:56.0	-10.86
01:57.0	-9.84
01:58.0	-9.18
01:59.0	-8.68
02:00.0	-8.72
02:01.0	-9.03
02:02.0	-8.9
02:03.0	-8.58
02:04.0	-7.89
02:05.0	-8.17
02:06.0	-8.54
02:07.0	-9.21

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:08.0	-8.88
02:09.0	-8.97
02:10.0	-9.42
02:11.0	-9.04
02:12.0	-8.88
02:13.0	-9.08
02:14.0	-9.43
02:15.0	-9.06
02:16.0	-7.99
02:17.0	-8.28
02:18.0	-8.01
02:19.0	-7.16
02:20.0	-6.56
02:21.0	-7.11
02:22.0	-7.23
02:23.0	-6.69
02:24.0	-5.88
02:25.0	-5.66
02:26.0	-5.82
02:27.0	-5.94
02:28.0	-6.26
02:29.0	-6.14
02:30.0	-6.06
02:31.0	-5.99
02:32.0	-6.05
02:33.0	-6.28
02:34.0	-5.58
02:35.0	-4.84
02:36.0	-4.33
02:37.0	-4.7
02:38.0	-4.92
02:39.0	-4.6
02:40.0	-4.19
02:41.0	-4.5
02:42.0	-4.83
02:43.0	-5.1
02:44.0	-5.02
02:45.0	-4.6
02:46.0	-4.53
02:47.0	-4.79
02:48.0	-4.9

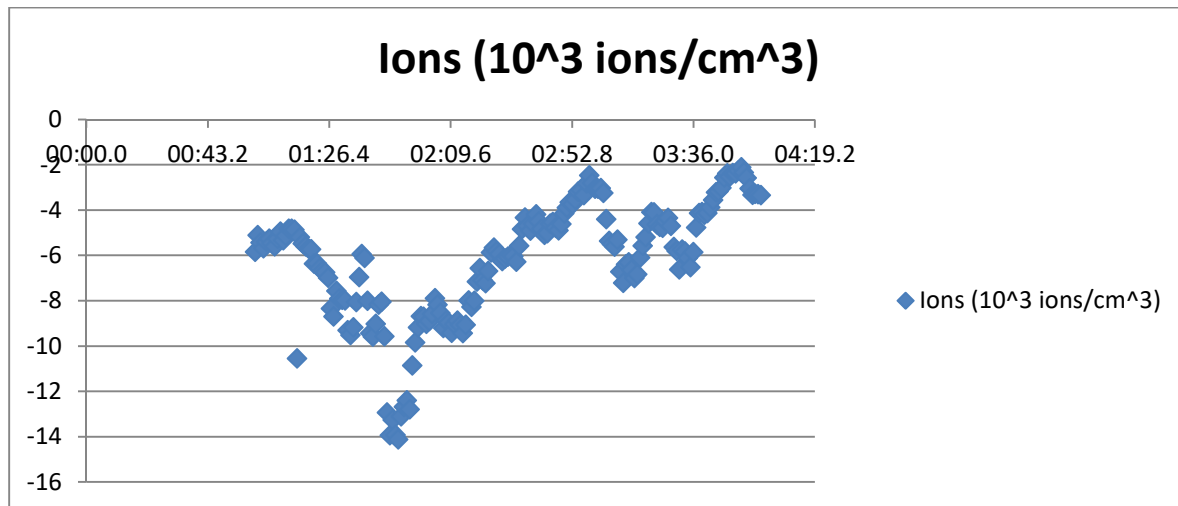
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:49.0	-4.62
02:50.0	-4.15
02:51.0	-3.89
02:52.0	-3.66
02:53.0	-3.74
02:54.0	-3.55
02:55.0	-3.19
02:56.0	-3.12
02:57.0	-3.35
02:58.0	-2.83
02:59.0	-2.47
03:00.0	-2.81
03:01.0	-3.06
03:02.0	-3.07
03:03.0	-3.03
03:04.0	-3.24
03:05.0	-4.41
03:06.0	-5.37
03:07.0	-5.5
03:08.0	-5.62
03:09.0	-5.31
03:10.0	-6.72
03:11.0	-7.22
03:12.0	-6.4
03:13.0	-6.31
03:14.0	-6.64
03:15.0	-7.01
03:16.0	-6.84
03:17.0	-6.1
03:18.0	-5.58
03:19.0	-5.19
03:20.0	-4.59
03:21.0	-4.09
03:22.0	-4.11
03:23.0	-4.63
03:24.0	-4.75
03:25.0	-4.78
03:26.0	-4.49
03:27.0	-4.35
03:28.0	-4.7
03:29.0	-5.64

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:30.0	-5.81
03:31.0	-6.62
03:32.0	-5.75
03:33.0	-5.83
03:34.0	-6.11
03:35.0	-6.52
03:36.0	-5.86
03:37.0	-4.77
03:38.0	-4.13
03:39.0	-4.1
03:40.0	-4.21
03:41.0	-4.13
03:42.0	-3.88
03:43.0	-3.56
03:44.0	-3.22
03:45.0	-3.18
03:46.0	-3.02
03:47.0	-2.57
03:48.0	-2.38
03:49.0	-2.52
03:50.0	-2.37
03:51.0	-2.39
03:52.0	-2.26
03:53.0	-2.12
03:54.0	-2.34
03:55.0	-2.59
03:56.0	-3.05
03:57.0	-3.33
03:58.0	-3.29
03:59.0	-3.3
04:00.0	-3.34
04:01.0	-3.28
04:02.0	-3.63

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
04:03.0	-3.64
04:04.0	-3.21
04:05.0	-3.11
04:06.0	-3.26
04:07.0	-3.47
04:08.0	-3.37
04:09.0	-3.33
04:10.0	-3.68
04:11.0	-4.16
04:12.0	-4.69
04:13.0	-4.84
04:14.0	-4.38
04:15.0	-4.26
04:16.0	-4.48
04:17.0	-4.53
04:18.0	-4.57
04:19.0	-4.47
04:20.0	-3.8
04:21.0	-3.24
04:22.0	-2.97
04:23.0	-2.76
04:24.0	-2.98
04:25.0	-3.21
04:26.0	-3.26
04:27.0	-3.36
04:28.0	-3.4
04:29.0	-3.34
04:30.0	-3.47
04:31.0	-3.59
04:32.0	-3.81
04:33.0	-4.4
04:34.0	-4.44

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos , eliminando los resultados del primer minuto. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-6.19
MODA	-4.83
MÍNIMO	-2.12
MÁXIMO	-14.13



B) VELOCIDAD V WHITE

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:00.0	-38.74
00:01.0	-37.87
00:02.0	-35.59
00:03.0	-34.45
00:04.0	-32.93
00:05.0	-30.24
00:06.0	-27.36
00:07.0	-28.5
00:08.0	-31.46
00:09.0	-35.75
00:10.0	-38.71
00:11.0	-38.18
00:12.0	-35.59
00:13.0	-35.89
00:14.0	-32.62
00:15.0	-30.2
00:16.0	-29.29
00:17.0	-28.48
00:18.0	-29.16

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:19.0	-27.66
00:20.0	-25.1
00:21.0	-23.61
00:22.0	-24.76
00:23.0	-29.38
00:24.0	-33.05
00:25.0	-36.72
00:26.0	-40.73
00:27.0	-37.88
00:28.0	-30.32
00:29.0	-27.12
00:30.0	-29.48
00:31.0	-31.61
00:32.0	-32.89
00:33.0	-32.29
00:34.0	-32.01
00:35.0	-33.06
00:36.0	-34.05
00:37.0	-31.59

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:38.0	-30.58
00:39.0	-30.27
00:40.0	-28.14
00:41.0	-26.05
00:42.0	-26.86
00:43.0	-26.94
00:44.0	-27.54
00:45.0	-29.28
00:46.0	-30.14
00:47.0	-31.41
00:48.0	-31.22
00:49.0	-31.11
00:50.0	-33
00:51.0	-34.99
00:52.0	-32.96
00:53.0	-27.17
00:54.0	-26.25
00:55.0	-29.08
00:56.0	-30.84
00:57.0	-26.36
00:58.0	-25.02
00:59.0	-25.96
01:00.0	-28
01:01.0	-28.47
01:02.0	-31.37
01:03.0	-32.1
01:04.0	-31.42
01:05.0	-31.15
01:06.0	-33.16
01:07.0	-34.04
01:08.0	-37.12
01:09.0	-37.2
01:10.0	-31.29
01:11.0	-29.61
01:12.0	-30.19
01:13.0	-33
01:14.0	-33.51
01:15.0	-28.64
01:16.0	-23.49
01:17.0	-18.13
01:18.0	-15.72

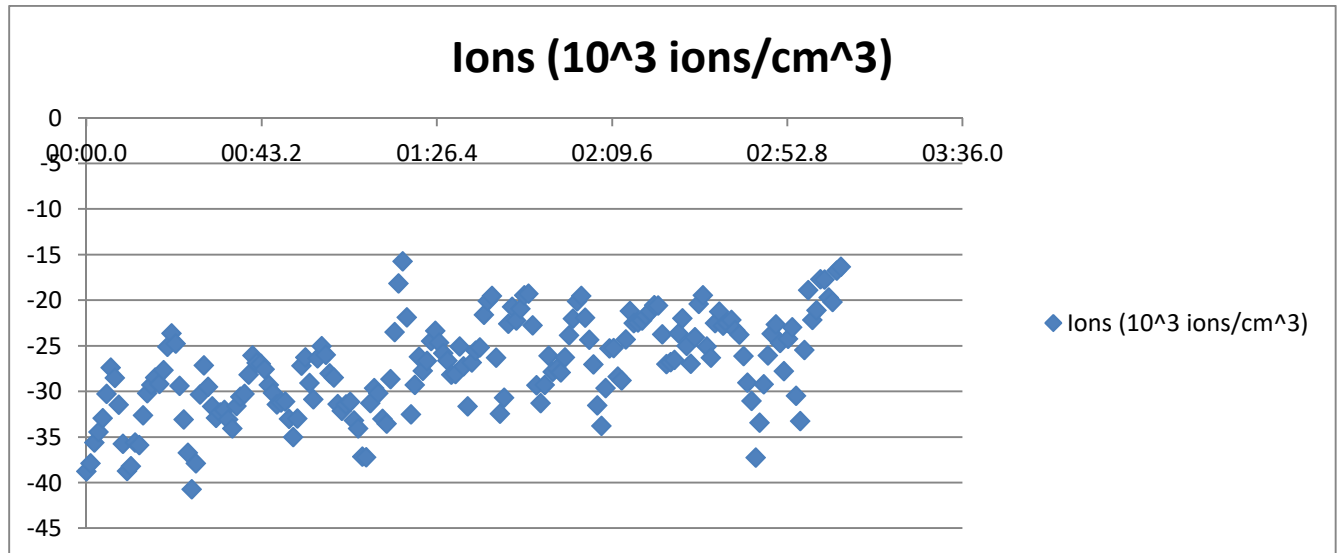
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:19.0	-21.88
01:20.0	-32.52
01:21.0	-29.26
01:22.0	-26.18
01:23.0	-27.74
01:24.0	-26.64
01:25.0	-24.47
01:26.0	-23.35
01:27.0	-24.65
01:28.0	-25.81
01:29.0	-26.61
01:30.0	-28.14
01:31.0	-28.09
01:32.0	-25.05
01:33.0	-27.22
01:34.0	-31.64
01:35.0	-26.82
01:36.0	-25.51
01:37.0	-25.18
01:38.0	-21.59
01:39.0	-20.06
01:40.0	-19.51
01:41.0	-26.29
01:42.0	-32.43
01:43.0	-30.67
01:44.0	-22.58
01:45.0	-20.7
01:46.0	-22.23
01:47.0	-20.92
01:48.0	-19.43
01:49.0	-19.26
01:50.0	-22.73
01:51.0	-29.31
01:52.0	-31.26
01:53.0	-29.28
01:54.0	-26.09
01:55.0	-27.83
01:56.0	-27.5
01:57.0	-27.89
01:58.0	-26.25
01:59.0	-23.84

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:00.0	-22.02
02:01.0	-20.12
02:02.0	-19.5
02:03.0	-21.89
02:04.0	-24.33
02:05.0	-27.04
02:06.0	-31.52
02:07.0	-33.78
02:08.0	-29.63
02:09.0	-25.28
02:10.0	-25.25
02:11.0	-28.36
02:12.0	-28.79
02:13.0	-24.3
02:14.0	-21.15
02:15.0	-22.49
02:16.0	-22.42
02:17.0	-22.2
02:18.0	-21.64
02:19.0	-21.22
02:20.0	-20.52
02:21.0	-20.57
02:22.0	-23.73
02:23.0	-26.98
02:24.0	-26.77
02:25.0	-26.53
02:26.0	-23.63
02:27.0	-21.96
02:28.0	-24.99
02:29.0	-26.95
02:30.0	-24.03
02:31.0	-20.4
02:32.0	-19.44
02:33.0	-25.05

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:34.0	-26.29
02:35.0	-22.51
02:36.0	-21.22
02:37.0	-22.78
02:38.0	-22.45
02:39.0	-22.14
02:40.0	-23.27
02:41.0	-23.77
02:42.0	-26.13
02:43.0	-29.02
02:44.0	-31.03
02:45.0	-37.25
02:46.0	-33.4
02:47.0	-29.22
02:48.0	-26.04
02:49.0	-23.66
02:50.0	-22.63
02:51.0	-24.68
02:52.0	-27.77
02:53.0	-24.23
02:54.0	-22.94
02:55.0	-30.48
02:56.0	-33.25
02:57.0	-25.46
02:58.0	-18.87
02:59.0	-22.13
03:00.0	-21.08
03:01.0	-17.68
03:02.0	-17.73
03:03.0	-19.68
03:04.0	-20.17
03:05.0	-16.74
03:06.0	-16.32

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos. A continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-27.35
MODA	-35.59
MÍNIMO	-15.72
MÁXIMO	-40.73



C) VELOCIDAD V2

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:00.0	-23.45
00:01.0	-48.26
00:02.0	-52.04
00:03.0	-56.45
00:04.0	-59.1
00:05.0	-58.47
00:06.0	-61.69
00:07.0	-63.06
00:08.0	-63.54
00:09.0	-63.64
00:10.0	-64.49
00:11.0	-60.39
00:12.0	-58.23
00:13.0	-62
00:14.0	-63.04
00:15.0	-69.08
00:16.0	-77.31
00:17.0	-75.89
00:18.0	-70.93

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:19.0	-72.82
00:20.0	-76.09
00:21.0	-73.58
00:22.0	-71.71
00:23.0	-60.09
00:24.0	-41.19
00:25.0	-43.19
00:26.0	-41.57
00:27.0	-37.85
00:28.0	-35.45
00:29.0	-23.48
00:30.0	-19.9
00:31.0	-27.21
00:32.0	-45.02
00:33.0	-55.35
00:34.0	-58.34
00:35.0	-61.62
00:36.0	-60.32
00:37.0	-55.38

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:38.0	-53.59
00:39.0	-50.85
00:40.0	-48.21
00:41.0	-48.64
00:42.0	-47.82
00:43.0	-42.96
00:44.0	-35.89
00:45.0	-39.25
00:46.0	-45.17
00:47.0	-48.5
00:48.0	-54.63
00:49.0	-61.02
00:50.0	-60.85
00:51.0	-50.55
00:52.0	-39.54
00:53.0	-30.87
00:54.0	-27.02
00:55.0	-24.93
00:56.0	-31.06
00:57.0	-35.19
00:58.0	-35.24
00:59.0	-43.69
01:00.0	-61.24
01:01.0	-54.55
01:02.0	-61.29
01:03.0	-68.13
01:04.0	-67.75
01:05.0	-63.88
01:06.0	-58.35
01:07.0	-63.51
01:08.0	-71.5
01:09.0	-79.21
01:10.0	-73.15
01:11.0	-63.15
01:12.0	-58.68
01:13.0	-67.33
01:14.0	-63.74
01:15.0	-62.47
01:16.0	-59.12
01:17.0	-51.8
01:18.0	-48.83

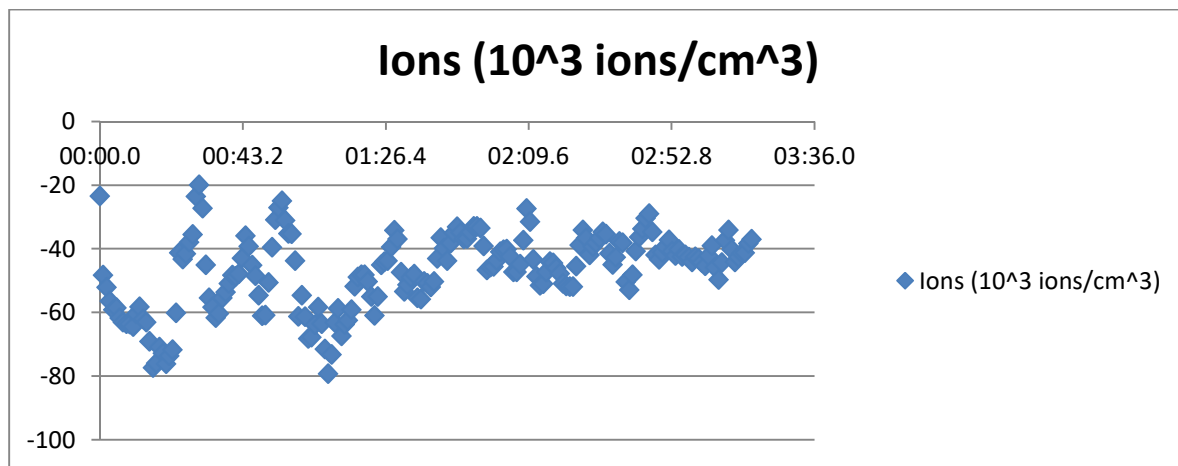
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:19.0	-48.18
01:20.0	-48.12
01:21.0	-50.32
01:22.0	-54.97
01:23.0	-60.98
01:24.0	-55.03
01:25.0	-45.07
01:26.0	-44.04
01:27.0	-43.73
01:28.0	-39.38
01:29.0	-34.19
01:30.0	-36.86
01:31.0	-47.31
01:32.0	-53.34
01:33.0	-51.29
01:34.0	-48.96
01:35.0	-47.93
01:36.0	-55.36
01:37.0	-55.78
01:38.0	-50.28
01:39.0	-50.91
01:40.0	-51.97
01:41.0	-50.26
01:42.0	-43
01:43.0	-36.47
01:44.0	-39.77
01:45.0	-43.74
01:46.0	-38.25
01:47.0	-34.97
01:48.0	-33.08
01:49.0	-34.91
01:50.0	-36.93
01:51.0	-36.78
01:52.0	-34.83
01:53.0	-32.96
01:54.0	-33.01
01:55.0	-33.43
01:56.0	-39.09
01:57.0	-46.62
01:58.0	-45.7
01:59.0	-45.52

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:00.0	-43.63
02:01.0	-40.95
02:02.0	-40.27
02:03.0	-40.13
02:04.0	-42.45
02:05.0	-47.29
02:06.0	-47.29
02:07.0	-44.84
02:08.0	-37.31
02:09.0	-27.37
02:10.0	-31.42
02:11.0	-43.35
02:12.0	-48.69
02:13.0	-51.46
02:14.0	-50.96
02:15.0	-47.28
02:16.0	-44.03
02:17.0	-44.46
02:18.0	-46.04
02:19.0	-47.75
02:20.0	-50.85
02:21.0	-51.64
02:22.0	-51.87
02:23.0	-51.84
02:24.0	-45.42
02:25.0	-38.84
02:26.0	-34.03
02:27.0	-36.61
02:28.0	-41.88
02:29.0	-39.32
02:30.0	-38.06
02:31.0	-36.62
02:32.0	-34.72
02:33.0	-35.35
02:34.0	-41.4
02:35.0	-44.94
02:36.0	-42.66
02:37.0	-37.69
02:38.0	-38.1
02:39.0	-50.36

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:40.0	-52.89
02:41.0	-48.18
02:42.0	-40.72
02:43.0	-36.33
02:44.0	-33.68
02:45.0	-30.36
02:46.0	-28.99
02:47.0	-34.68
02:48.0	-41.88
02:49.0	-43.31
02:50.0	-41.07
02:51.0	-39.35
02:52.0	-37.19
02:53.0	-40.77
02:54.0	-42.12
02:55.0	-40.22
02:56.0	-42.47
02:57.0	-41.91
02:58.0	-42.67
02:59.0	-44.12
03:00.0	-42.55
03:01.0	-43.1
03:02.0	-44.29
03:03.0	-45.38
03:04.0	-42.19
03:05.0	-38.96
03:06.0	-45.84
03:07.0	-49.63
03:08.0	-44.3
03:09.0	-37.3
03:10.0	-34.04
03:11.0	-40.26
03:12.0	-44.13
03:13.0	-42.6
03:14.0	-41.29
03:15.0	-41.18
03:16.0	-38.35
03:17.0	-36.95

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-47.18
MODA	-50.85
MÍNIMO	-19.9
MÁXIMO	-79.21



D) VELOCIDAD V3

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:00.0	-3.2
00:01.0	-18.18
00:02.0	-50.88
00:03.0	-66.59
00:04.0	-73.78
00:05.0	-79.33
00:06.0	-78.04
00:07.0	-75.59
00:08.0	-74.77
00:09.0	-65.06
00:10.0	-52.29
00:11.0	-67.54
00:12.0	-77.54
00:13.0	-84.75
00:14.0	-88.41
00:15.0	-89.74
00:16.0	-84.76

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:17.0	-72.87
00:18.0	-73.99
00:19.0	-71.37
00:20.0	-68.4
00:21.0	-63.46
00:22.0	-61.74
00:23.0	-60.67
00:24.0	-61.59
00:25.0	-71.84
00:26.0	-70.48
00:27.0	-67.61
00:28.0	-62.75
00:29.0	-55.31
00:30.0	-68.48
00:31.0	-72.78
00:32.0	-60.77
00:33.0	-51.03

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:34.0	-49.6
00:35.0	-62.36
00:36.0	-64.22
00:37.0	-55.76
00:38.0	-45.76
00:39.0	-48.1
00:40.0	-63.98
00:41.0	-71.27
00:42.0	-72.55
00:43.0	-82.44
00:44.0	-78.13
00:45.0	-68.66
00:46.0	-60.12
00:47.0	-54.23
00:48.0	-55.18
00:49.0	-64.9
00:50.0	-68.64
00:51.0	-63.72
00:52.0	-58.2
00:53.0	-60.95
00:54.0	-61.17
00:55.0	-60.25
00:56.0	-61.74
00:57.0	-53.83
00:58.0	-43.62
00:59.0	-42.98
01:00.0	-42.09
01:01.0	-49.68
01:02.0	-44.81
01:03.0	-41.14
01:04.0	-37.07
01:05.0	-26.66
01:06.0	-27.51
01:07.0	-27.53
01:08.0	-25.7
01:09.0	-35.37
01:10.0	-34.44
01:11.0	-32.19
01:12.0	-39.61
01:13.0	-48.64
01:14.0	-49.9

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:15.0	-45.35
01:16.0	-30.19
01:17.0	-39.64
01:18.0	-42.4
01:19.0	-44.5
01:20.0	-52.11
01:21.0	-52.81
01:22.0	-45.12
01:23.0	-36.29
01:24.0	-30.43
01:25.0	-26.01
01:26.0	-24.24
01:27.0	-34.96
01:28.0	-44.9
01:29.0	-46.73
01:30.0	-55.54
01:31.0	-64.94
01:32.0	-69.95
01:33.0	-56.13
01:34.0	-41.63
01:35.0	-30.26
01:36.0	-30
01:37.0	-28.85
01:38.0	-27.85
01:39.0	-23.73
01:40.0	-21.77
01:41.0	-16.92
01:42.0	-15.19
01:43.0	-15.08
01:44.0	-16.17
01:45.0	-17.81
01:46.0	-17.4
01:47.0	-22.9
01:48.0	-29.25
01:49.0	-37.43
01:50.0	-42.96
01:51.0	-40.77
01:52.0	-36.33
01:53.0	-34.97
01:54.0	-44.27
01:55.0	-50.28

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:56.0	-49.39
01:57.0	-43.49
01:58.0	-31.31
01:59.0	-28.17
02:00.0	-31.49
02:01.0	-38.17
02:02.0	-38.57
02:03.0	-27.31
02:04.0	-22.18
02:05.0	-29.17
02:06.0	-38.43
02:07.0	-41.47
02:08.0	-43.16
02:09.0	-42.67
02:10.0	-38.65
02:11.0	-29.18
02:12.0	-33.32
02:13.0	-43.99
02:14.0	-47.93
02:15.0	-47.21
02:16.0	-44.97
02:17.0	-39.9
02:18.0	-35.21
02:19.0	-35.33
02:20.0	-39.96
02:21.0	-36.68
02:22.0	-48.03
02:23.0	-44.91
02:24.0	-36.34
02:25.0	-36.05
02:26.0	-47.54
02:27.0	-59.75
02:28.0	-59.51
02:29.0	-66.77
02:30.0	-76.66
02:31.0	-70.15
02:32.0	-55.04
02:33.0	-51.82
02:34.0	-49.73
02:35.0	-39.42
02:36.0	-34.81

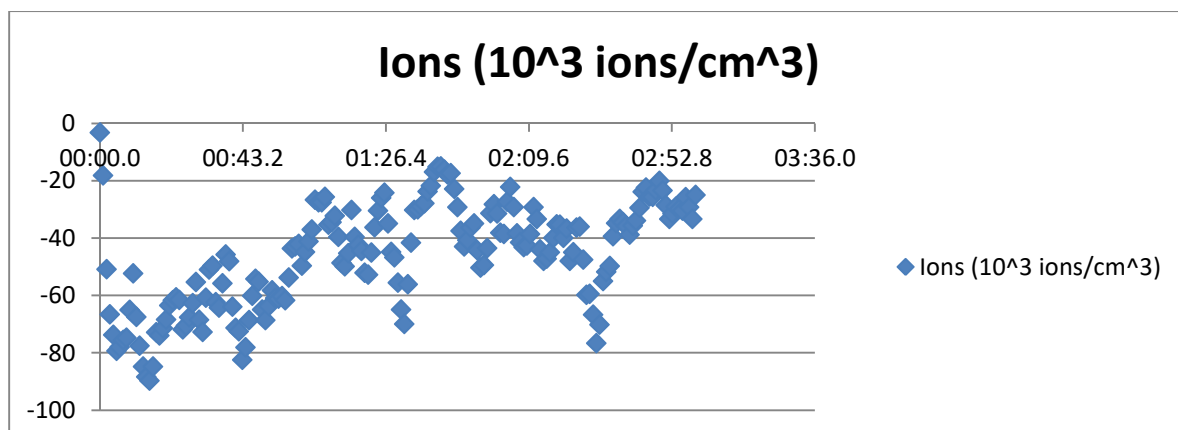
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:37.0	-33.34
02:38.0	-34.48
02:39.0	-35.8
02:40.0	-38.83
02:41.0	-35.75
02:42.0	-33.87
02:43.0	-29.49
02:44.0	-23.89
02:45.0	-22.38
02:46.0	-25.54
02:47.0	-25.65
02:48.0	-23.32
02:49.0	-20.04
02:50.0	-23.46
02:51.0	-28.51
02:52.0	-33.38
02:53.0	-31.42
02:54.0	-29.13
02:55.0	-29.92
02:56.0	-30.43
02:57.0	-25.73
02:58.0	-29.28
02:59.0	-33.41
03:00.0	-25.01
03:01.0	-19.89
03:02.0	-21.82
03:03.0	-17.69
03:04.0	-14.61
03:05.0	-23.31
03:06.0	-35.17
03:07.0	-41.75
03:08.0	-42.66
03:09.0	-29.92
03:10.0	-22.82
03:11.0	-37.63
03:12.0	-51.32
03:13.0	-45.95
03:14.0	-36.76
03:15.0	-37.56
03:16.0	-44.52
03:17.0	-50

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
03:18.0	-43.23
03:19.0	-32.72
03:20.0	-36.73
03:21.0	-38.27
03:22.0	-33.68
03:23.0	-22.95
03:24.0	-18.95
03:25.0	-23.37
03:26.0	-23.37
03:27.0	-32.01
03:28.0	-43.1
03:29.0	-45.94
03:30.0	-44.26
03:31.0	-51.52
03:32.0	-52.67

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
03:33.0	-52.06
03:34.0	-53
03:35.0	-56.11
03:36.0	-50.93
03:37.0	-48.06
03:38.0	-58.02
03:39.0	-56.55
03:40.0	-52.64
03:41.0	-54.41
03:42.0	-49.71
03:43.0	-49.81
03:44.0	-53.77
03:45.0	-48.4
03:46.0	-43.67

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-45.97
MODA	-61.74
MÍNIMO	-3.2
MÁXIMO	-89.74

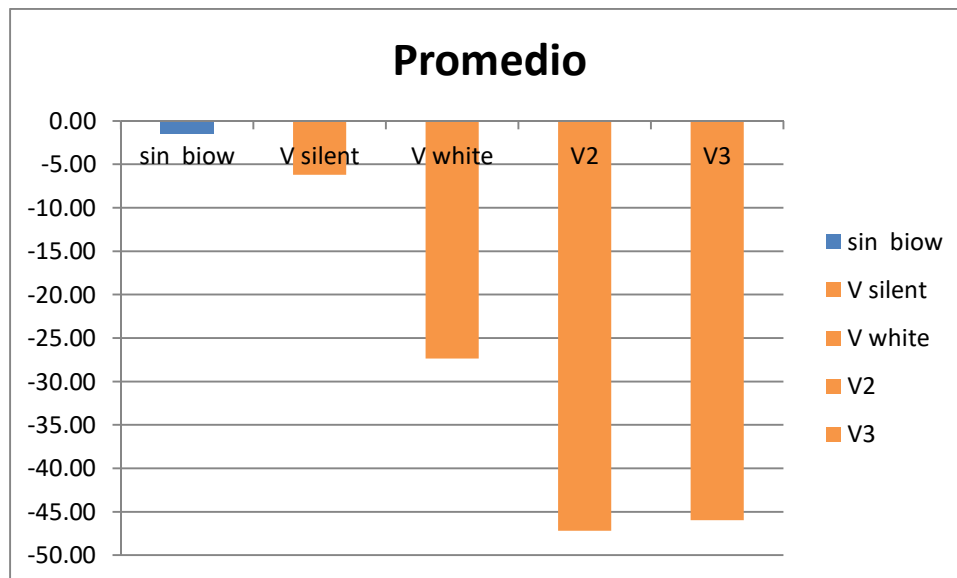


4. CONCLUSIONES

Si analizamos los datos obtenidos de los muestreos realizados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

De las mediciones realizadas se puede deducir que el uso de la unidad BIOW 60 incrementa el número de iones negativos en el ambiente. En líneas generales el incremento de este tipo de iones es mayor a mayor velocidad de funcionamiento de la unidad.

	BIOW 60				
	sin biow	V silent	V white	V2	V3
Promedio	-1.49	-6.19	-27.35	-47.18	-45.97





**INFORME SOBRE EMISION DE ANIONES
BIODISPONIBLES**

BIOWAIR TOTAL SYSTEMS, S.L.



Fdo. Pablo Jalón Monzón

Técnico Analiza Calidad

Informe emitido el 30/11/2021

**INFORME SOBRE EMISIÓN DE ANIONES
BIODISPONIBLES PARA ESTUDIO EN
LINFOCITOS PERIFÉRICOS CON UNIDAD DE
REGENERACIÓN CELULAR Y DESCANSO
BIOW 100**



Índice

1. OBJETO DEL ESTUDIO	3
2. METODOLOGÍA EMPLEADA	3
2.1 MEDICIÓN DE IONES	4
3. RESULTADOS ANALÍTICOS	5
3.1. MEDICIÓN DE IONES	5
3.1.1 MEDICIONES SIN BIOW	5
3.1.2 MEDICIONES CON BIOW 100	9
4. CONCLUSIONES	25

1. OBJETO DEL ESTUDIO

La finalidad de este estudio es comprobar que la unidad de regeneración y descanso celular BLOW, es capaz de generar la emisión de aniones biodisponibles para estudio en linfocitos periféricos.

Para la realización de este estudio se hicieron mediciones de iones, antes y después de la instalación de la unidad BLOW 100 a diferentes velocidades de funcionamiento.

2. METODOLOGÍA EMPLEADA

Las pruebas se realizaron en la Sala de Ensayos 3 de Climastar, situada en Km 7 AS-266, 33192, Asturias. La sala tiene unas dimensiones de 16,88 m² y tiene una altura de 2,40 m. Está diseñada de manera que el suelo está dividido en cuadrículas de 30x30, de tal manera que se puedan realizar las mediciones a diferentes medidas con gran precisión.

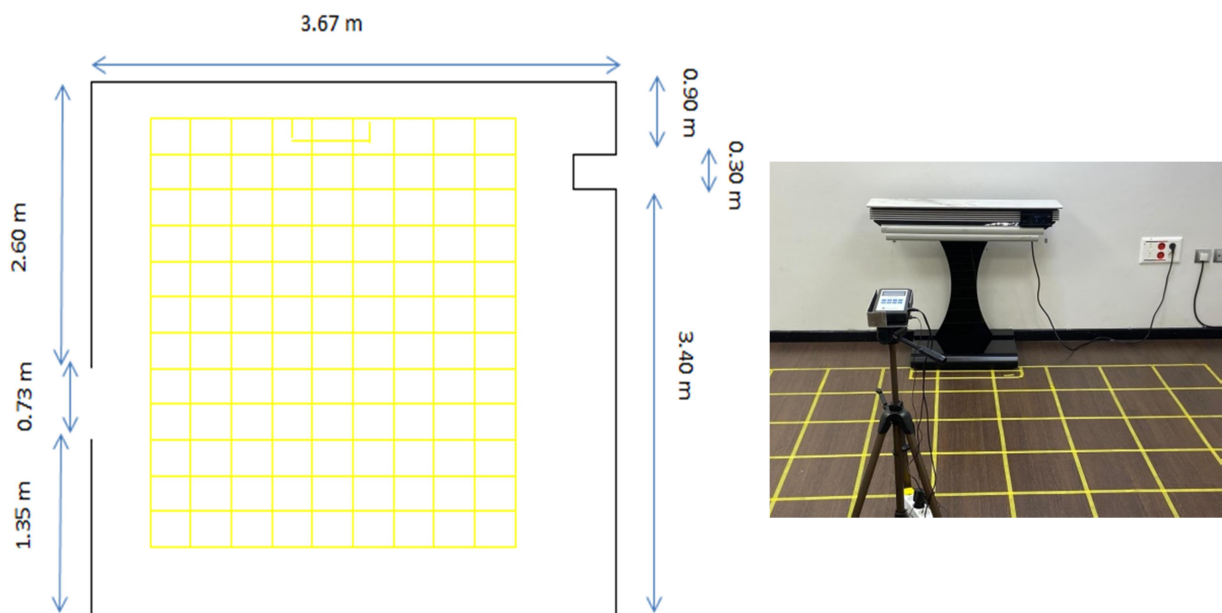


Imagen 1: Sala de ensayos 3 - Climastar

Para la realización de este estudio se realizaron las siguientes mediciones:

- Medición de iones en la sala.

2.1 MEDICIÓN DE IONES

Para la medición de los iones se utilizó el equipo “Air Ion Counter Model AIC 2” de la marca AlphaLab INC. Este equipo mide el número de iones negativos y positivos en el aire.



Imagen 2: Medidor de Iones

3. RESULTADOS ANALÍTICOS

La toma de muestras fue realizada el día 5/11/2021.

Para la realización de los ensayos se situó el medidor de iones a una distancia de 1,30 m del equipo Biow 100 y a 90 cm del suelo.

A continuación se representan los resultados correspondientes a las mediciones realizadas antes y después de la instalación del equipo Biow 100 a diferentes velocidades de funcionamiento del equipo.

3.1. MEDICIÓN DE IONES

Los resultados obtenidos en los muestreos ambientales realizados en la Sala de ensayos fueron los siguientes:

3.1.1 MEDICIONES SIN BIOW

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:00.0	-1.12
00:01.0	-2.49
00:02.0	-2.02
00:03.0	-1.87
00:04.0	-1.87
00:05.0	-1.86
00:06.0	-2.09
00:07.0	-2.03
00:08.0	-2.12
00:09.0	-2.34
00:10.0	-1.99
00:11.0	-1.81
00:12.0	-1.75
00:13.0	-1.9
00:14.0	-2.25
00:15.0	-2.22
00:16.0	-2.22
00:17.0	-2.21
00:18.0	-2.2
00:19.0	-2.11
00:20.0	-2.53
00:21.0	-2.75

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:22.0	-2.68
00:23.0	-2.51
00:24.0	-2.49
00:25.0	-2.58
00:26.0	-2.85
00:27.0	-3.11
00:28.0	-2.99
00:29.0	-2.71
00:30.0	-2.61
00:31.0	-2.66
00:32.0	-2.69
00:33.0	-2.77
00:34.0	-2.87
00:35.0	-2.72
00:36.0	-2.39
00:37.0	-2.45
00:38.0	-2.42
00:39.0	-2.45
00:40.0	-2.36
00:41.0	-2.26
00:42.0	-2.19
00:43.0	-2.23

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:44.0	-2.44
00:45.0	-2.32
00:46.0	-2.38
00:47.0	-2.39
00:48.0	-2.17
00:49.0	-1.93
00:50.0	-2.01
00:51.0	-2.72
00:52.0	-2.46
00:53.0	-2.06
00:54.0	-2.03
00:55.0	-1.96
00:56.0	-1.82
00:57.0	-1.78
00:58.0	-2.06
00:59.0	-2.22
01:00.0	-2.38
01:01.0	-2.07
01:02.0	-1.86
01:03.0	-1.88
01:04.0	-1.95
01:05.0	-1.89
01:06.0	-1.97
01:07.0	-2.18
01:08.0	-2.16
01:09.0	-1.92
01:10.0	-1.99
01:11.0	-1.85
01:12.0	-2.05
01:13.0	-2.08
01:14.0	-2.07
01:15.0	-2.22
01:16.0	-2.52
01:17.0	-2.29
01:18.0	-1.96
01:19.0	-2.17
01:20.0	-2.23
01:21.0	-2.1
01:22.0	-2.04
01:23.0	-2.1
01:24.0	-2.03

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:25.0	-1.86
01:26.0	-1.9
01:27.0	-2.03
01:28.0	-2.04
01:29.0	-2.16
01:30.0	-2.55
01:31.0	-2.35
01:32.0	-2.34
01:33.0	-2.36
01:34.0	-2.3
01:35.0	-1.77
01:36.0	-1.66
01:37.0	-1.79
01:38.0	-1.62
01:39.0	-1.35
01:40.0	-1.23
01:41.0	-0.99
01:42.0	-0.86
01:43.0	-0.82
01:44.0	-0.88
01:45.0	-1.1
01:46.0	-1
01:47.0	-1.09
01:48.0	-1.11
01:49.0	-1.04
01:50.0	-1.09
01:51.0	-1.5
01:52.0	-1.56
01:53.0	-1.62
01:54.0	-1.61
01:55.0	-1.41
01:56.0	-1.1
01:57.0	-1.26
01:58.0	-1.22
01:59.0	-0.93
02:00.0	-0.86
02:01.0	-0.94
02:02.0	-0.84
02:03.0	-0.9
02:04.0	-0.99
02:05.0	-1.04

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:06.0	-1.08
02:07.0	-0.94
02:08.0	-0.99
02:09.0	-1.02
02:10.0	-1.23
02:11.0	-1.38
02:12.0	-1.35
02:13.0	-1.5
02:14.0	-1.29
02:15.0	-1.67
02:16.0	-1.56
02:17.0	-1.67
02:18.0	-1.48
02:19.0	-1.24
02:20.0	-1.13
02:21.0	-1.13
02:22.0	-1.03
02:23.0	-1.03
02:24.0	-1.25
02:25.0	-1.24
02:26.0	-1.15
02:27.0	-1.25
02:28.0	-1.17
02:29.0	-1.23
02:30.0	-1.38
02:31.0	-1.4
02:32.0	-1.35
02:33.0	-1.35
02:34.0	-1.23
02:35.0	-1.17
02:36.0	-1.08
02:37.0	-0.79
02:38.0	-0.64
02:39.0	-0.65
02:40.0	-0.86
02:41.0	-1.04
02:42.0	-1.2
02:43.0	-1.06
02:44.0	-0.99
02:45.0	-1.26
02:46.0	-1.51

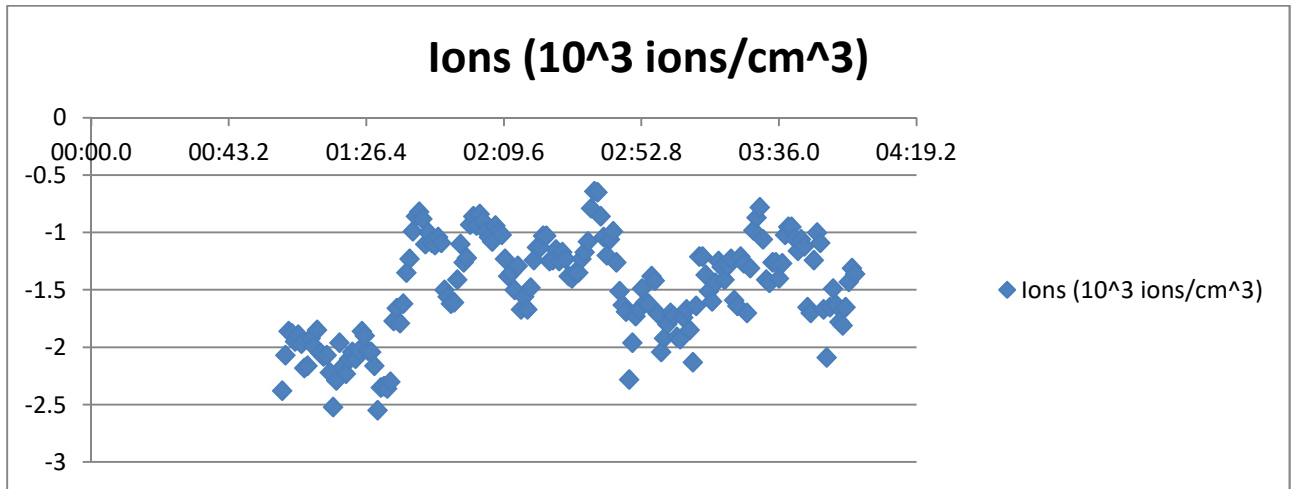
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:47.0	-1.63
02:48.0	-1.69
02:49.0	-2.28
02:50.0	-1.96
02:51.0	-1.73
02:52.0	-1.67
02:53.0	-1.49
02:54.0	-1.61
02:55.0	-1.62
02:56.0	-1.38
02:57.0	-1.42
02:58.0	-1.71
02:59.0	-2.04
03:00.0	-1.92
03:01.0	-1.8
03:02.0	-1.7
03:03.0	-1.73
03:04.0	-1.91
03:05.0	-1.93
03:06.0	-1.74
03:07.0	-1.67
03:08.0	-1.85
03:09.0	-2.13
03:10.0	-1.64
03:11.0	-1.21
03:12.0	-1.21
03:13.0	-1.37
03:14.0	-1.51
03:15.0	-1.6
03:16.0	-1.44
03:17.0	-1.25
03:18.0	-1.3
03:19.0	-1.41
03:20.0	-1.29
03:21.0	-1.23
03:22.0	-1.59
03:23.0	-1.64
03:24.0	-1.21
03:25.0	-1.27
03:26.0	-1.7
03:27.0	-1.31

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:28.0	-0.98
03:29.0	-0.87
03:30.0	-0.78
03:31.0	-1.06
03:32.0	-1.41
03:33.0	-1.44
03:34.0	-1.26
03:35.0	-1.26
03:36.0	-1.4
03:37.0	-1.27
03:38.0	-1.02
03:39.0	-0.95
03:40.0	-0.95
03:41.0	-1.05
03:42.0	-1.16
03:43.0	-1.06
03:44.0	-1.12
03:45.0	-1.65
03:46.0	-1.7
03:47.0	-1.24
03:48.0	-1
03:49.0	-1.09
03:50.0	-1.67
03:51.0	-2.09
03:52.0	-1.65
03:53.0	-1.49
03:54.0	-1.63

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:55.0	-1.78
03:56.0	-1.81
03:57.0	-1.65
03:58.0	-1.43
03:59.0	-1.31
04:00.0	-1.36
04:01.0	-1.46
04:02.0	-1.73
04:03.0	-1.82
04:04.0	-1.87
04:05.0	-1.78
04:06.0	-1.5
04:07.0	-1.46
04:08.0	-1.58
04:09.0	-1.78
04:10.0	-1.65
04:11.0	-1.64
04:12.0	-1.68
04:13.0	-1.86
04:14.0	-1.87
04:15.0	-1.79
04:16.0	-1.97
04:17.0	-2.19
04:18.0	-2.25
04:19.0	-2.43
04:20.0	-2.67

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos , eliminando los resultados del primer minuto. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-1.49
MODA	-1.23
MINIMO	-0.64
MÁXIMO	-2.55



3.1.2 MEDICIONES CON BIOW 100

A) VELOCIDAD V SILENT

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:00.0	-4.47
00:01.0	-9.69
00:02.0	-11.59
00:03.0	-12.33
00:04.0	-13.56
00:05.0	-13.64
00:06.0	-15.07
00:07.0	-18.01
00:08.0	-27.21
00:09.0	-33.88
00:10.0	-35.86
00:11.0	-38.69
00:12.0	-38.43
00:13.0	-36.58
00:14.0	-39.29
00:15.0	-40.36
00:16.0	-38.65
00:17.0	-35.75
00:18.0	-34.94
00:19.0	-37.59
00:20.0	-41.29
00:21.0	-43.48
00:22.0	-44.37

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:23.0	-42.57
00:24.0	-39.81
00:25.0	-37.93
00:26.0	-42.58
00:27.0	-40.47
00:28.0	-37.15
00:29.0	-32.93
00:30.0	-31.27
00:31.0	-38.38
00:32.0	-41.67
00:33.0	-33.1
00:34.0	-16.44
00:35.0	-10.74
00:36.0	-8.16
00:37.0	-7.48
00:38.0	-8.5
00:39.0	-13.97
00:40.0	-17.02
00:41.0	-15.31
00:42.0	-12.72
00:43.0	-11.53
00:44.0	-11.37
00:45.0	-16.2

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:46.0	-27.75
00:47.0	-36.62
00:48.0	-32.24
00:49.0	-21.51
00:50.0	-19.09
00:51.0	-19.64
00:52.0	-24.16
00:53.0	-27.33
00:54.0	-24.3
00:55.0	-22.21
00:56.0	-18.13
00:57.0	-23.11
00:58.0	-24.19
00:59.0	-16.89
01:00.0	-10.51
01:01.0	-6.96
01:02.0	-7.92
01:03.0	-8.5
01:04.0	-8.38
01:05.0	-7.46
01:06.0	-6.24
01:07.0	-5.54
01:08.0	-5
01:09.0	-4.93
01:10.0	-5.35
01:11.0	-5.69
01:12.0	-4.67
01:13.0	-4.11
01:14.0	-4.17
01:15.0	-4.05
01:16.0	-3.7
01:17.0	-3.65
01:18.0	-3.94
01:19.0	-3.6
01:20.0	-3.49
01:21.0	-3.45
01:22.0	-3.73
01:23.0	-4.12
01:24.0	-4.11
01:25.0	-3.81
01:26.0	-3.72

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:27.0	-3.8
01:28.0	-3.6
01:29.0	-3.65
01:30.0	-3.91
01:31.0	-4.3
01:32.0	-4.56
01:33.0	-4.71
01:34.0	-4.77
01:35.0	-4.66
01:36.0	-4.65
01:37.0	-4.72
01:38.0	-5
01:39.0	-4.66
01:40.0	-4.53
01:41.0	-4.33
01:42.0	-3.92
01:43.0	-3.91
01:44.0	-3.77
01:45.0	-3.9
01:46.0	-3.82
01:47.0	-4.06
01:48.0	-3.81
01:49.0	-3.47
01:50.0	-3.3
01:51.0	-3.34
01:52.0	-3.35
01:53.0	-3.4
01:54.0	-3.57
01:55.0	-3.48
01:56.0	-3.5
01:57.0	-3.83
01:58.0	-3.84
01:59.0	-3.42
02:00.0	-3.09
02:01.0	-3.02
02:02.0	-3.44
02:03.0	-3.57
02:04.0	-3.29
02:05.0	-3.16
02:06.0	-2.9
02:07.0	-2.84

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:08.0	-2.84
02:09.0	-2.92
02:10.0	-2.99
02:11.0	-3.08
02:12.0	-3.14
02:13.0	-3.01
02:14.0	-2.83
02:15.0	-2.72
02:16.0	-2.83
02:17.0	-2.87
02:18.0	-3.16
02:19.0	-3.26
02:20.0	-3.04
02:21.0	-2.81
02:22.0	-2.89
02:23.0	-3.26
02:24.0	-3.74
02:25.0	-4.28
02:26.0	-4.31
02:27.0	-3.56
02:28.0	-3.32
02:29.0	-3.15
02:30.0	-3.09
02:31.0	-3.07
02:32.0	-3.07
02:33.0	-3.32
02:34.0	-3.15
02:35.0	-3.09
02:36.0	-3.29
02:37.0	-3.54
02:38.0	-3.89
02:39.0	-3.64
02:40.0	-3.54
02:41.0	-3.48
02:42.0	-3.48
02:43.0	-3.64
02:44.0	-3.76
02:45.0	-3.57
02:46.0	-3.31
02:47.0	-3.03
02:48.0	-2.98

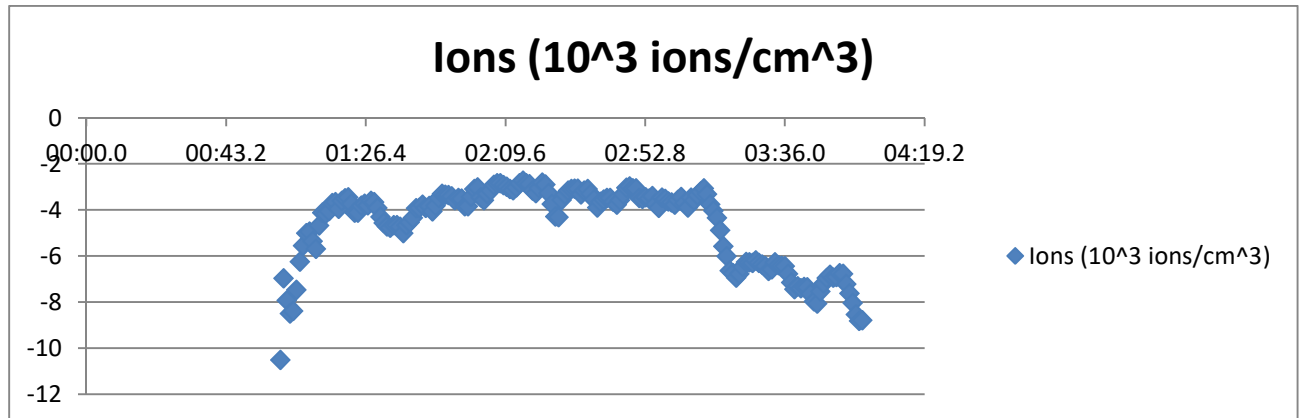
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:49.0	-3.05
02:50.0	-3.06
02:51.0	-3.47
02:52.0	-3.52
02:53.0	-3.44
02:54.0	-3.5
02:55.0	-3.39
02:56.0	-3.74
02:57.0	-3.91
02:58.0	-3.46
02:59.0	-3.52
03:00.0	-3.63
03:01.0	-3.67
03:02.0	-3.77
03:03.0	-3.56
03:04.0	-3.43
03:05.0	-3.69
03:06.0	-3.89
03:07.0	-3.46
03:08.0	-3.59
03:09.0	-3.35
03:10.0	-3.19
03:11.0	-3.06
03:12.0	-3.31
03:13.0	-3.75
03:14.0	-4.03
03:15.0	-4.34
03:16.0	-4.88
03:17.0	-5.58
03:18.0	-6.01
03:19.0	-6.63
03:20.0	-6.74
03:21.0	-6.94
03:22.0	-6.77
03:23.0	-6.47
03:24.0	-6.25
03:25.0	-6.27
03:26.0	-6.3
03:27.0	-6.19
03:28.0	-6.3
03:29.0	-6.37

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:30.0	-6.43
03:31.0	-6.65
03:32.0	-6.57
03:33.0	-6.27
03:34.0	-6.39
03:35.0	-6.42
03:36.0	-6.44
03:37.0	-6.77
03:38.0	-7.14
03:39.0	-7.43
03:40.0	-7.31
03:41.0	-7.4
03:42.0	-7.34
03:43.0	-7.35
03:44.0	-7.65
03:45.0	-7.97
03:46.0	-8.06
03:47.0	-7.53
03:48.0	-7.19
03:49.0	-6.95
03:50.0	-6.81
03:51.0	-6.93
03:52.0	-6.91
03:53.0	-6.74
03:54.0	-6.77
03:55.0	-7.21
03:56.0	-7.62
03:57.0	-8.03
03:58.0	-8.53
03:59.0	-8.81
04:00.0	-8.79
04:01.0	-9.03
04:02.0	-9.23
04:03.0	-9.14
04:04.0	-8.78
04:05.0	-8.75

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
04:06.0	-8.2
04:07.0	-7.45
04:08.0	-6.85
04:09.0	-6.18
04:10.0	-5.64
04:11.0	-5.29
04:12.0	-5.14
04:13.0	-5.15
04:14.0	-5.06
04:15.0	-5.03
04:16.0	-5.07
04:17.0	-5.22
04:18.0	-5.4
04:19.0	-5.27
04:20.0	-5.16
04:21.0	-5.2
04:22.0	-5.2
04:23.0	-5.14
04:24.0	-5.1
04:25.0	-4.98
04:26.0	-4.77
04:27.0	-4.6
04:28.0	-4.69
04:29.0	-4.78
04:30.0	-5.16
04:31.0	-5.49
04:32.0	-6.03
04:33.0	-7.35
04:34.0	-7.82
04:35.0	-7.7
04:36.0	-6.91
04:37.0	-6.11
04:38.0	-5.38
04:39.0	-5

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos , eliminando los resultados del primer minuto. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-4.64
MODA	-3.91
MÍNIMO	-2.72
MÁXIMO	-10.51



B) VELOCIDAD V WHITE

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:00.0	-15.78
00:01.0	-16.41
00:02.0	-16.38
00:03.0	-9.26
00:04.0	-8.16
00:05.0	-7.65
00:06.0	-13.72
00:07.0	-30.72
00:08.0	-26.85
00:09.0	-20.26
00:10.0	-14.34
00:11.0	-14.92
00:12.0	-20.71
00:13.0	-27.4
00:14.0	-34.13
00:15.0	-35.65
00:16.0	-33.13
00:17.0	-28.71
00:18.0	-28.36
00:19.0	-27.48
00:20.0	-22.58
00:21.0	-20.97
00:22.0	-21.92

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:23.0	-22.63
00:24.0	-33.24
00:25.0	-24.06
00:26.0	-12.83
00:27.0	-12.6
00:28.0	-25.81
00:29.0	-35.41
00:30.0	-40.5
00:31.0	-37.45
00:32.0	-37.34
00:33.0	-40.36
00:34.0	-37.37
00:35.0	-33.72
00:36.0	-26.19
00:37.0	-15.72
00:38.0	-8.15
00:39.0	-6.49
00:40.0	-5.83
00:41.0	-4.2
00:42.0	-3.67
00:43.0	-3.7
00:44.0	-3.77
00:45.0	-3.72

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:46.0	-3.73
00:47.0	-3.62
00:48.0	-3.54
00:49.0	-3.28
00:50.0	-3.29
00:51.0	-3.45
00:52.0	-3.56
00:53.0	-3.59
00:54.0	-3.63
00:55.0	-3.27
00:56.0	-3.15
00:57.0	-3.3
00:58.0	-3.48
00:59.0	-2.93
01:00.0	-3.12
01:01.0	-4.91
01:02.0	-8.65
01:03.0	-11.99
01:04.0	-15.05
01:05.0	-15.31
01:06.0	-14.08
01:07.0	-15.02
01:08.0	-14.93
01:09.0	-13.56
01:10.0	-10.86
01:11.0	-8.95
01:12.0	-7.68
01:13.0	-7.35
01:14.0	-6.83
01:15.0	-6.64
01:16.0	-7.36
01:17.0	-7.47
01:18.0	-7.37
01:19.0	-7.6
01:20.0	-6.77
01:21.0	-5.52
01:22.0	-5.17
01:23.0	-5.7
01:24.0	-6.14
01:25.0	-6.3
01:26.0	-6.58

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:27.0	-6.97
01:28.0	-7.68
01:29.0	-7.6
01:30.0	-7.65
01:31.0	-7.93
01:32.0	-8.66
01:33.0	-10.45
01:34.0	-12.48
01:35.0	-13.61
01:36.0	-13.63
01:37.0	-13.11
01:38.0	-11.44
01:39.0	-8.92
01:40.0	-7.93
01:41.0	-7.66
01:42.0	-8.06
01:43.0	-8.46
01:44.0	-9.01
01:45.0	-10.19
01:46.0	-10.19
01:47.0	-9.23
01:48.0	-8.64
01:49.0	-8.06
01:50.0	-8.02
01:51.0	-8.62
01:52.0	-9.12
01:53.0	-9.11
01:54.0	-8.91
01:55.0	-8.17
01:56.0	-6.79
01:57.0	-5.62
01:58.0	-5.77
01:59.0	-6.64
02:00.0	-7.13
02:01.0	-7.32
02:02.0	-7.47
02:03.0	-7.15
02:04.0	-7.03
02:05.0	-7.34
02:06.0	-8.21
02:07.0	-11.02

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:08.0	-13.92
02:09.0	-12.46
02:10.0	-9.87
02:11.0	-9.65
02:12.0	-10.37
02:13.0	-9.63
02:14.0	-8.67
02:15.0	-8.46
02:16.0	-8.58
02:17.0	-8.78
02:18.0	-8.61
02:19.0	-8.76
02:20.0	-9.38
02:21.0	-9.12
02:22.0	-8.56
02:23.0	-8.88
02:24.0	-9.55
02:25.0	-9.74
02:26.0	-9.56
02:27.0	-9.53
02:28.0	-10.45
02:29.0	-12.08
02:30.0	-11.89
02:31.0	-10.21
02:32.0	-9.32
02:33.0	-9.71
02:34.0	-10.43
02:35.0	-11.72
02:36.0	-11.22
02:37.0	-10.09
02:38.0	-12.17
02:39.0	-14.68
02:40.0	-15.62
02:41.0	-15.26
02:42.0	-14.39
02:43.0	-14.33
02:44.0	-14.05
02:45.0	-12.12
02:46.0	-11.34
02:47.0	-11.23
02:48.0	-11.12

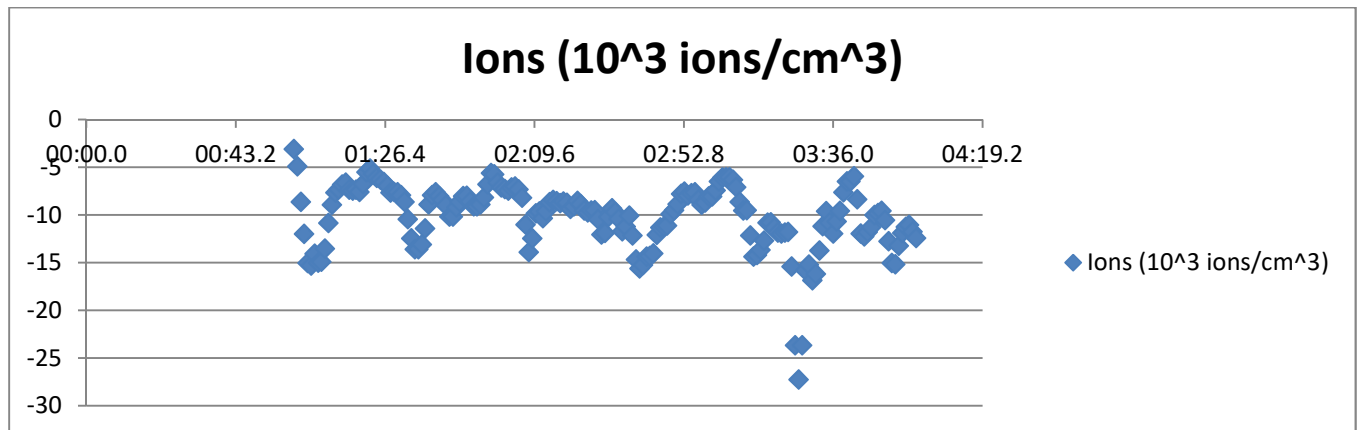
#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:49.0	-9.92
02:50.0	-9.52
02:51.0	-8.89
02:52.0	-7.81
02:53.0	-7.58
02:54.0	-7.99
02:55.0	-7.73
02:56.0	-7.64
02:57.0	-8.42
02:58.0	-8.95
02:59.0	-8.72
03:00.0	-8.08
03:01.0	-8.07
03:02.0	-7.43
03:03.0	-6.49
03:04.0	-6.1
03:05.0	-6.08
03:06.0	-6.06
03:07.0	-6.33
03:08.0	-7.09
03:09.0	-8.65
03:10.0	-9.57
03:11.0	-9.51
03:12.0	-12.18
03:13.0	-14.37
03:14.0	-14.23
03:15.0	-13.67
03:16.0	-12.72
03:17.0	-10.83
03:18.0	-10.8
03:19.0	-11.37
03:20.0	-11.87
03:21.0	-11.98
03:22.0	-11.87
03:23.0	-11.8
03:24.0	-15.44
03:25.0	-23.67
03:26.0	-27.27
03:27.0	-23.69
03:28.0	-15.82
03:29.0	-15.23

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:30.0	-16.87
03:31.0	-16.2
03:32.0	-13.74
03:33.0	-11.19
03:34.0	-9.62
03:35.0	-10.83
03:36.0	-11.97
03:37.0	-10.69
03:38.0	-9.6
03:39.0	-7.66
03:40.0	-6.51
03:41.0	-6.51
03:42.0	-5.98
03:43.0	-8.37
03:44.0	-11.96
03:45.0	-12.27
03:46.0	-11.8
03:47.0	-11.29
03:48.0	-10.01
03:49.0	-9.84
03:50.0	-9.59
03:51.0	-10.57
03:52.0	-12.78
03:53.0	-15.06
03:54.0	-15.19
03:55.0	-13.24
03:56.0	-11.91
03:57.0	-11.28
03:58.0	-11.08
03:59.0	-11.77
04:00.0	-12.44
04:01.0	-14.08
04:02.0	-15.17
04:03.0	-13.39
04:04.0	-11.2
04:05.0	-10.08

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
04:06.0	-10.25
04:07.0	-12.26
04:08.0	-13.63
04:09.0	-13.08
04:10.0	-12.81
04:11.0	-19.25
04:12.0	-24.88
04:13.0	-20.89
04:14.0	-18.74
04:15.0	-14.62
04:16.0	-10.93
04:17.0	-10.54
04:18.0	-10.77
04:19.0	-10.84
04:20.0	-12.12
04:21.0	-11.35
04:22.0	-8.66
04:23.0	-8.54
04:24.0	-9.41
04:25.0	-9.55
04:26.0	-9.64
04:27.0	-10.01
04:28.0	-9.42
04:29.0	-8.39
04:30.0	-7.41
04:31.0	-6.68
04:32.0	-6.28
04:33.0	-7.61
04:34.0	-9.68
04:35.0	-8
04:36.0	-11.27
04:37.0	-18.07
04:38.0	-18.71
04:39.0	-17.64

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos , eliminando los resultados del primer minuto. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-10.16
MODA	-8.65
MÍNIMO	-3.12
MÁXIMO	-27.27



C) VELOCIDAD V2

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:00.0	-20.13
00:01.0	-24.23
00:02.0	-22.17
00:03.0	-17.92
00:04.0	-15.3
00:05.0	-21.86
00:06.0	-26.09
00:07.0	-23.52
00:08.0	-22.95
00:09.0	-24.58
00:10.0	-21.39
00:11.0	-15.87
00:12.0	-10.79
00:13.0	-7.8
00:14.0	-10.04
00:15.0	-18.36
00:16.0	-24.37
00:17.0	-25.79
00:18.0	-28.99
00:19.0	-25.67

Time	Ions (10^3 ions/cm ³)
00:20.0	-21.71
00:21.0	-17.88
00:22.0	-12.99
00:23.0	-8.25
00:24.0	-7.18
00:25.0	-13.34
00:26.0	-24.29
00:27.0	-31.52
00:28.0	-36.54
00:29.0	-33.12
00:30.0	-31.16
00:31.0	-33.46
00:32.0	-33.31
00:33.0	-34.68
00:34.0	-40.47
00:35.0	-40.84
00:36.0	-38.99
00:37.0	-39.22
00:38.0	-40.05
00:39.0	-37.85

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:40.0	-35.31
00:41.0	-33.25
00:42.0	-32.89
00:43.0	-33.42
00:44.0	-32.76
00:45.0	-28.03
00:46.0	-23.11
00:47.0	-20.91
00:48.0	-20
00:49.0	-17.91
00:50.0	-14.79
00:51.0	-15.68
00:52.0	-17.99
00:53.0	-16.64
00:54.0	-13.1
00:55.0	-8.45
00:56.0	-5.51
00:57.0	-5.01
00:58.0	-4.66
00:59.0	-4.21
01:00.0	-4.25
01:01.0	-4.38
01:02.0	-4.3
01:03.0	-4.65
01:04.0	-4.79
01:05.0	-5.92
01:06.0	-7.29
01:07.0	-5.68
01:08.0	-4.53
01:09.0	-4.4
01:10.0	-5.09
01:11.0	-6.33
01:12.0	-7.02
01:13.0	-6.18
01:14.0	-4.95
01:15.0	-6.22
01:16.0	-6.59
01:17.0	-8.11
01:18.0	-6.79
01:19.0	-4.84
01:20.0	-4.56

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:21.0	-8.38
01:22.0	-16.81
01:23.0	-21.53
01:24.0	-22.64
01:25.0	-21.69
01:26.0	-21.62
01:27.0	-19.74
01:28.0	-18.36
01:29.0	-20.31
01:30.0	-22.21
01:31.0	-19.44
01:32.0	-19.59
01:33.0	-21.65
01:34.0	-17.75
01:35.0	-18
01:36.0	-16.22
01:37.0	-12.48
01:38.0	-17.27
01:39.0	-26.44
01:40.0	-32.35
01:41.0	-31.16
01:42.0	-25.84
01:43.0	-21.78
01:44.0	-18.62
01:45.0	-17.1
01:46.0	-20.48
01:47.0	-23.41
01:48.0	-29.71
01:49.0	-29.56
01:50.0	-25.83
01:51.0	-23.31
01:52.0	-24.38
01:53.0	-28.33
01:54.0	-28.72
01:55.0	-27.93
01:56.0	-25.28
01:57.0	-24.88
01:58.0	-23.76
01:59.0	-22.23
02:00.0	-22.15
02:01.0	-19.99

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:02.0	-17.77
02:03.0	-16.16
02:04.0	-15.45
02:05.0	-16.62
02:06.0	-18.18
02:07.0	-14.94
02:08.0	-11.6
02:09.0	-11.6
02:10.0	-12.46
02:11.0	-13.37
02:12.0	-17.08
02:13.0	-21
02:14.0	-20.37
02:15.0	-17.42
02:16.0	-13.07
02:17.0	-12
02:18.0	-11.22
02:19.0	-9.19
02:20.0	-10.8
02:21.0	-9.66
02:22.0	-8.74
02:23.0	-13.45
02:24.0	-20.46
02:25.0	-21.02
02:26.0	-19.2
02:27.0	-22.08
02:28.0	-24.61
02:29.0	-24.27
02:30.0	-21.47
02:31.0	-20.18
02:32.0	-19.64
02:33.0	-17.94
02:34.0	-16.94
02:35.0	-21.75
02:36.0	-31.28
02:37.0	-30.64
02:38.0	-25.16
02:39.0	-22.17
02:40.0	-27.45
02:41.0	-27.9
02:42.0	-25.8

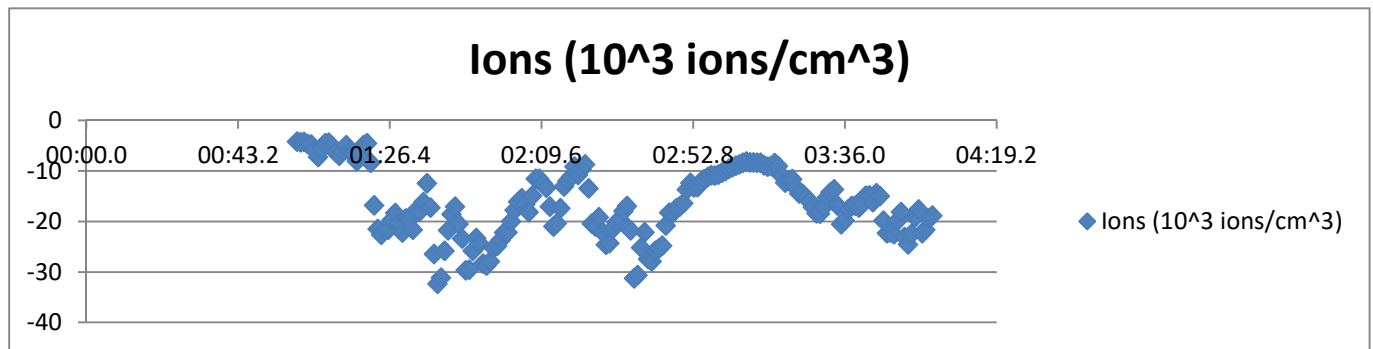
Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:43.0	-25.37
02:44.0	-24.79
02:45.0	-20.81
02:46.0	-18.3
02:47.0	-18.34
02:48.0	-17.43
02:49.0	-17.03
02:50.0	-16.41
02:51.0	-13.71
02:52.0	-12.4
02:53.0	-13.29
02:54.0	-13.21
02:55.0	-12.17
02:56.0	-11.62
02:57.0	-11.21
02:58.0	-10.89
02:59.0	-10.95
03:00.0	-10.78
03:01.0	-10.38
03:02.0	-10.07
03:03.0	-9.64
03:04.0	-9.32
03:05.0	-8.97
03:06.0	-8.75
03:07.0	-8.38
03:08.0	-8.15
03:09.0	-8.33
03:10.0	-8.33
03:11.0	-8.43
03:12.0	-8.44
03:13.0	-8.91
03:14.0	-9.18
03:15.0	-9.02
03:16.0	-8.45
03:17.0	-9.05
03:18.0	-10.92
03:19.0	-12.32
03:20.0	-11.92
03:21.0	-11.66
03:22.0	-13.29
03:23.0	-14.49

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:24.0	-14.63
03:25.0	-15.36
03:26.0	-15.99
03:27.0	-17.18
03:28.0	-18.44
03:29.0	-18.48
03:30.0	-17.15
03:31.0	-15.24
03:32.0	-14.21
03:33.0	-13.65
03:34.0	-16.89
03:35.0	-20.55
03:36.0	-19.82
03:37.0	-17.66
03:38.0	-16.96
03:39.0	-16.92
03:40.0	-17.29
03:41.0	-16.54
03:42.0	-14.92
03:43.0	-14.84
03:44.0	-16.2
03:45.0	-14.42
03:46.0	-14.99
03:47.0	-19.87
03:48.0	-22.33
03:49.0	-22.21
03:50.0	-22.54
03:51.0	-19.89
03:52.0	-18.17
03:53.0	-23.1
03:54.0	-24.53
03:55.0	-22.45
03:56.0	-19.17
03:57.0	-17.68
03:58.0	-22.32
03:59.0	-21.62
04:00.0	-19.39

Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
04:01.0	-18.85
04:02.0	-29.01
04:03.0	-16.84
04:04.0	-16.54
04:05.0	-16.13
04:06.0	-14.66
04:07.0	-11.96
04:08.0	-8.54
04:09.0	-6.26
04:10.0	-5.11
04:11.0	-5.42
04:12.0	-6.71
04:13.0	-7.33
04:14.0	-10.73
04:15.0	-13.87
04:16.0	-13.83
04:17.0	-11.82
04:18.0	-9.91
04:19.0	-8.87
04:20.0	-8.86
04:21.0	-10.9
04:22.0	-14.92
04:23.0	-16.58
04:24.0	-18.83
04:25.0	-23.28
04:26.0	-25.65
04:27.0	-23.68
04:28.0	-19.95
04:29.0	-16.59
04:30.0	-15.29
04:31.0	-15.27
04:32.0	-13.52
04:33.0	-12.72
04:34.0	-14.82
04:35.0	-15.91
04:36.0	-17.72

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos , eliminando los resultados del primer minuto. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-16.33
MODA	-8.38
MÍNIMO	-4.25
MÁXIMO	-32.35



D) VELOCIDAD V3

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:00.0	-30.38
00:01.0	-31.8
00:02.0	-38.21
00:03.0	-46.37
00:04.0	-44.22
00:05.0	-49.15
00:06.0	-43.8
00:07.0	-33.68
00:08.0	-40.91
00:09.0	-45.73
00:10.0	-45.56
00:11.0	-45.2
00:12.0	-30.02
00:13.0	-24.57
00:14.0	-34.25
00:15.0	-45.61
00:16.0	-54.59
00:17.0	-33.53
00:18.0	-17.46

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:19.0	-26.32
00:20.0	-36.95
00:21.0	-47.76
00:22.0	-57.93
00:23.0	-54.09
00:24.0	-55.72
00:25.0	-65.83
00:26.0	-51.98
00:27.0	-42.16
00:28.0	-45.63
00:29.0	-55.37
00:30.0	-64.94
00:31.0	-60.12
00:32.0	-57.24
00:33.0	-47.7
00:34.0	-43.58
00:35.0	-47.02
00:36.0	-48.41
00:37.0	-42.79

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
00:38.0	-53.3
00:39.0	-53.95
00:40.0	-58.99
00:41.0	-49.83
00:42.0	-43.4
00:43.0	-47.68
00:44.0	-53.12
00:45.0	-46.76
00:46.0	-42.49
00:47.0	-39.89
00:48.0	-38.96
00:49.0	-38.7
00:50.0	-34.04
00:51.0	-26.29
00:52.0	-16.73
00:53.0	-12.81
00:54.0	-12.81
00:55.0	-10.3
00:56.0	-7.88
00:57.0	-9.77
00:58.0	-17.66
00:59.0	-19.08
01:00.0	-15.43
01:01.0	-12.59
01:02.0	-12.59
01:03.0	-17.85
01:04.0	-20.58
01:05.0	-20.62
01:06.0	-20.25
01:07.0	-20.21
01:08.0	-23.32
01:09.0	-18.94
01:10.0	-14.36
01:11.0	-17.88
01:12.0	-28.24
01:13.0	-37.08
01:14.0	-26.73
01:15.0	-18.33
01:16.0	-27.04
01:17.0	-42.4
01:18.0	-40.03

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
01:19.0	-35.68
01:20.0	-32.5
01:21.0	-31.05
01:22.0	-30.37
01:23.0	-35.56
01:24.0	-39.46
01:25.0	-35.09
01:26.0	-29.4
01:27.0	-24.68
01:28.0	-25.49
01:29.0	-34.75
01:30.0	-46.18
01:31.0	-46.73
01:32.0	-38.31
01:33.0	-35.11
01:34.0	-36.79
01:35.0	-38.32
01:36.0	-44.63
01:37.0	-42.86
01:38.0	-36.69
01:39.0	-34.45
01:40.0	-31.59
01:41.0	-26.34
01:42.0	-23.59
01:43.0	-21.05
01:44.0	-18.1
01:45.0	-17.11
01:46.0	-26.74
01:47.0	-27.87
01:48.0	-32.19
01:49.0	-39.26
01:50.0	-35.4
01:51.0	-32.02
01:52.0	-51.28
01:53.0	-55.05
01:54.0	-44.53
01:55.0	-55.38
01:56.0	-49.29
01:57.0	-42.35
01:58.0	-46.16
01:59.0	-44.33

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:00.0	-38.58
02:01.0	-32.83
02:02.0	-30.49
02:03.0	-34.73
02:04.0	-50.73
02:05.0	-42.76
02:06.0	-33.28
02:07.0	-25.67
02:08.0	-34.4
02:09.0	-36.66
02:10.0	-37.93
02:11.0	-38.94
02:12.0	-38.34
02:13.0	-41.56
02:14.0	-45.57
02:15.0	-46.81
02:16.0	-46.29
02:17.0	-56.68
02:18.0	-43.7
02:19.0	-29.17
02:20.0	-38.33
02:21.0	-44.44
02:22.0	-55.54
02:23.0	-63.34
02:24.0	-60.91
02:25.0	-72.49
02:26.0	-55.55
02:27.0	-41.54
02:28.0	-29.38
02:29.0	-40.55
02:30.0	-59.63
02:31.0	-52.57
02:32.0	-51.27
02:33.0	-45.79
02:34.0	-42.23
02:35.0	-46.33
02:36.0	-54.73
02:37.0	-51.68
02:38.0	-43.64
02:39.0	-46.85
02:40.0	-55.54

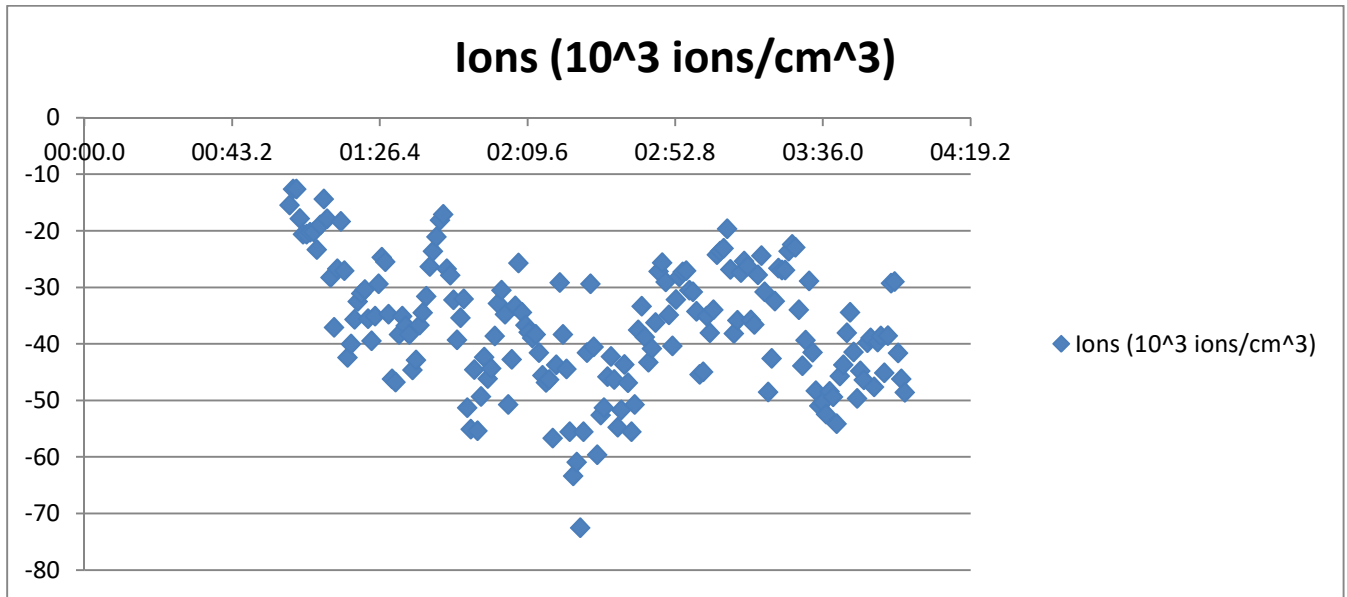
#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
02:41.0	-50.7
02:42.0	-37.51
02:43.0	-33.31
02:44.0	-38.77
02:45.0	-43.27
02:46.0	-40.79
02:47.0	-36.25
02:48.0	-27.16
02:49.0	-25.61
02:50.0	-29.02
02:51.0	-34.88
02:52.0	-40.33
02:53.0	-32.16
02:54.0	-28.14
02:55.0	-27.27
02:56.0	-27.05
02:57.0	-30.53
02:58.0	-30.79
02:59.0	-34.24
03:00.0	-45.41
03:01.0	-44.95
03:02.0	-35.08
03:03.0	-38.01
03:04.0	-33.98
03:05.0	-24.23
03:06.0	-23.58
03:07.0	-23.11
03:08.0	-19.66
03:09.0	-26.82
03:10.0	-38.13
03:11.0	-35.82
03:12.0	-27.37
03:13.0	-25.33
03:14.0	-26.28
03:15.0	-35.79
03:16.0	-36.58
03:17.0	-27.8
03:18.0	-24.4
03:19.0	-30.78
03:20.0	-48.5
03:21.0	-42.56

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:22.0	-32.42
03:23.0	-26.62
03:24.0	-26.93
03:25.0	-26.94
03:26.0	-23.59
03:27.0	-22.43
03:28.0	-22.91
03:29.0	-33.94
03:30.0	-43.86
03:31.0	-39.36
03:32.0	-28.86
03:33.0	-41.49
03:34.0	-48.26
03:35.0	-50.97
03:36.0	-50.34
03:37.0	-52.43
03:38.0	-48.41
03:39.0	-49.35
03:40.0	-54.12
03:41.0	-45.68
03:42.0	-43.7
03:43.0	-38.06
03:44.0	-34.41
03:45.0	-41.43
03:46.0	-49.66
03:47.0	-44.76
03:48.0	-46.34
03:49.0	-39.8
03:50.0	-38.94
03:51.0	-47.63

#Time	Ions (10 ³ ions/cm ³)
03:52.0	-39.68
03:53.0	-38.63
03:54.0	-45.13
03:55.0	-38.54
03:56.0	-29.27
03:57.0	-28.96
03:58.0	-41.59
03:59.0	-46.21
04:00.0	-48.57
04:01.0	-39.87
04:02.0	-24.59
04:03.0	-18.12
04:04.0	-21.38
04:05.0	-26.84
04:06.0	-30.5
04:07.0	-22.8
04:08.0	-20.09
04:09.0	-26.56
04:10.0	-19.58
04:11.0	-14.97
04:12.0	-20.24
04:13.0	-21.82
04:14.0	-24.47
04:15.0	-26.06
04:16.0	-19.5
04:17.0	-12.41
04:18.0	-16.02
04:19.0	-20.27
04:20.0	-17.58

Para la realización del estudio se tuvieron se realizaron mediciones de 3 minutos , eliminando los resultados del primer minuto. Teniendo en cuenta esto, a continuación se presenta la gráfica, así como la media, moda, el resultado máximo y el mínimo:

MEDIA	-36.78
MODA	-12.59
MÍNIMO	-12.59
MÁXIMO	-72.49

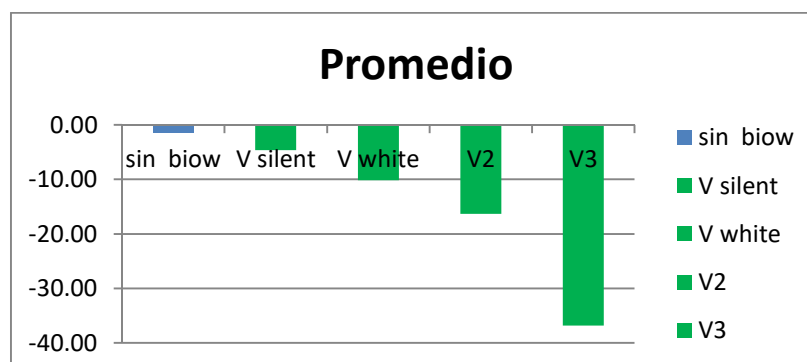


4. CONCLUSIONES

Si analizamos los datos obtenidos de los muestreos realizados se pueden extraer las siguientes conclusiones:

De las mediciones realizadas se puede deducir que el uso de la unidad BIOW 100 incrementa el número de iones negativos en el ambiente. En líneas generales el incremento de este tipo de iones es mayor a mayor velocidad de funcionamiento de la unidad.

	BIOW 100				
	sin biow	V silent	V white	V2	V3
Promedio	-1.49	-4.64	-10.16	-16.33	-36.78





Fdo. Pablo Jalón Monzón

Técnico Analiza Calidad

Informe emitido el 30/11/2021



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Cellular Response to Oxidative Stress (cROS)

Department of Cell Biology and Morphology

Faculty of Medicine

Oviedo University

Asturias. Spain

Phone: +34-985-3102779

Fax: +34-985-103618



INFORME APNEA E HIPOAPNEA OBSTRUCTIVA CRONICA

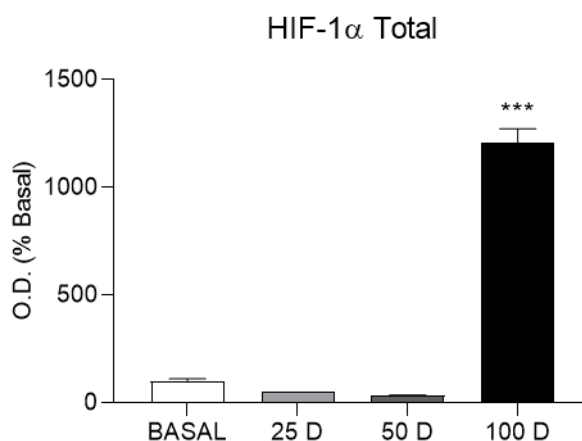
**Ha de tenerse en cuenta que los estudios proteómicos se explican siempre de forma comparativa entre los distintos grupos experimentales por lo que sería un error comparar el resultado numérico de un día y otro, debiendo basarse en las comparaciones realizadas de forma simultanea*

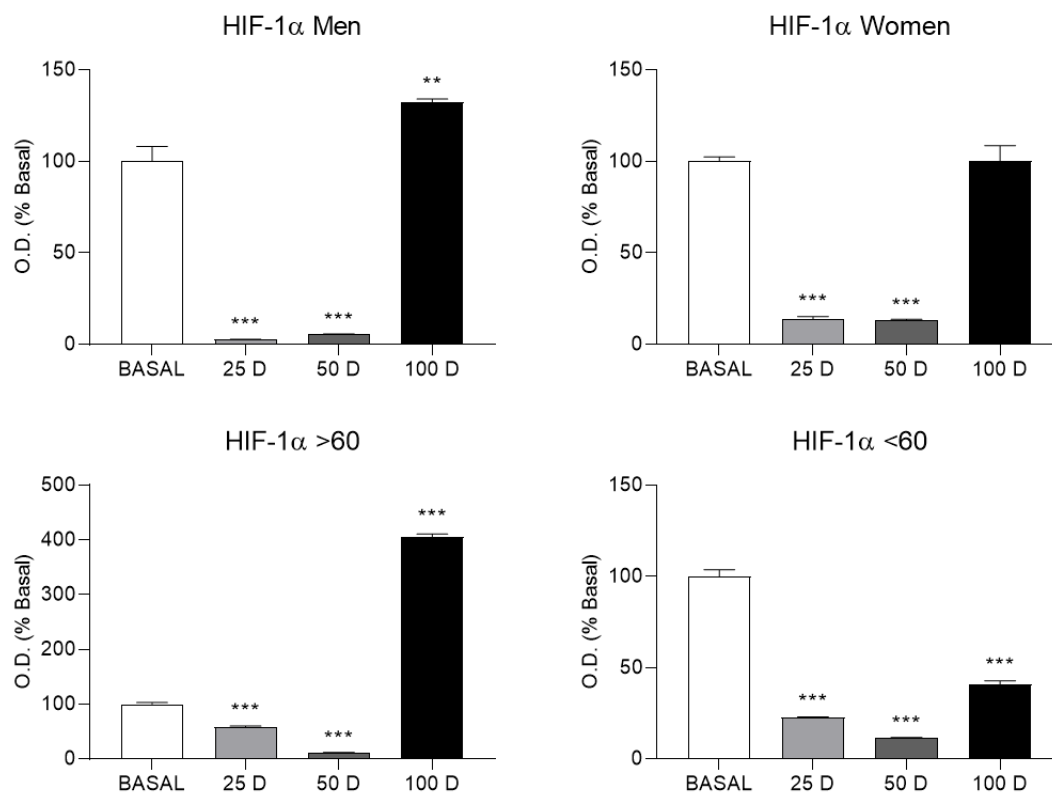
RESULTADOS PRELIMINARES

La apnea e hipoapnea obstructiva del sueño (AOS e HOS) son trastornos de la respiración del sueño con una alta prevalencia en la población sana. Este síndrome se ha asociado con enfermedades vasculares como el ictus, la hipertensión arterial y la fibrilación auricular, entre otras. (Gonzalez-Aquines et al., 2019). AOS se caracteriza por la aparición, durante el sueño, de episodios cíclicos de obstrucción completa (apnea) o parcial (hipopnea) de las vías respiratorias superiores durante más de 10 s, con la persistencia de movimientos toracoabdominales (Maniaci et al., 2021). La falta de una ventilación alveolar nocturna adecuada durante los episodios de apnea suele dar lugar a una reducción de la saturación de oxígeno de la sangre arterial y, en caso de esfuerzos prolongados, a un aumento gradual de la presión sanguínea de dióxido de carbono.

La prevalencia de AOS y HOS en la población general se sitúa habitualmente entre un 3% a un 7%, aunque algunas estimaciones indican que puede llegar al 15-20% en presencia de factores de riesgo como obesidad, tabaquismo. El envejecimiento se ha demostrado que incrementa la aparición de episodios de AOS y HOS hasta niveles similares a los provocados en situaciones de riesgo (Montserrat et al., 2004). Los radicales libres son un factor determinante en el desarrollo de AOS y HOS (Liu et al., 2019).

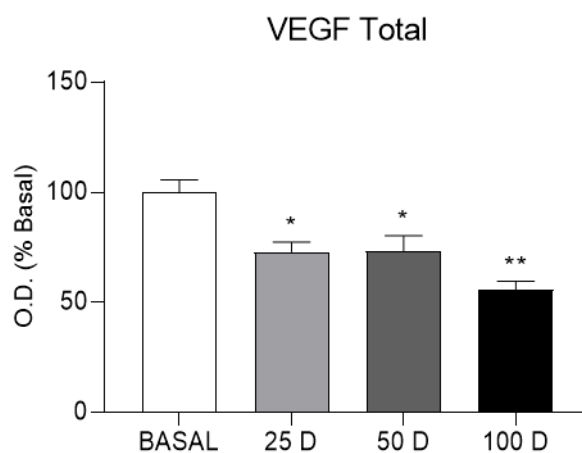
El HIF-1 se expresa en todas las células nucleadas en respuesta a la hipoxia. Es un factor de transcripción que activa genes de proteínas que median la respuesta adaptativa a la reducción de la biodisponibilidad del oxígeno.

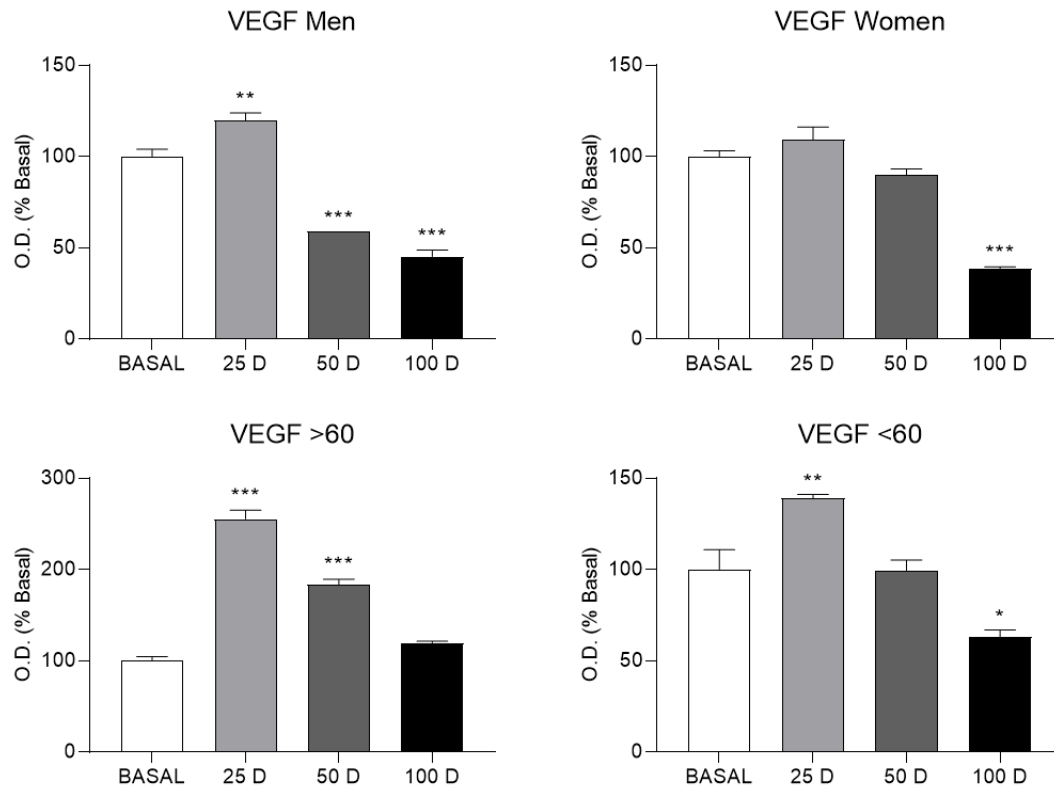




La hipoxia induce la activación de la expresión génica de HIF-1, que se inactiva rápidamente en presencia de oxígeno. El estrés oxidativo desempeñaría un papel importante en las vías de regulación dependientes del HIF-1 tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas (Montserrat et al., 2004). Los resultados parecen indicar que en los primeros momentos se dispara el HIF-1 para facilitar la respuesta a la hipoxia y con el tiempo, incrementando la oxigenación ya no sería necesario. Los hombres y las mujeres tienen una respuesta rápida. Las personas mayores precisan un incremento más prolongado de HIF-1 que los jóvenes, lo que se correlaciona con el agravamiento del proceso con la edad.

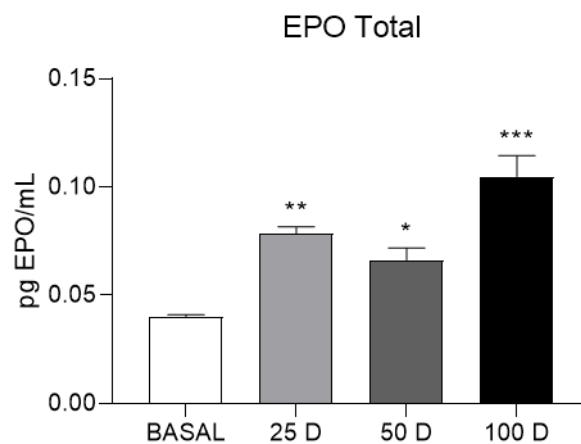
Entre los productos proteicos identificados de los genes diana del HIF-1 para aumentar la biodisponibilidad de oxígeno figuran, entre otros, al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la eritropoyetina (EPO).

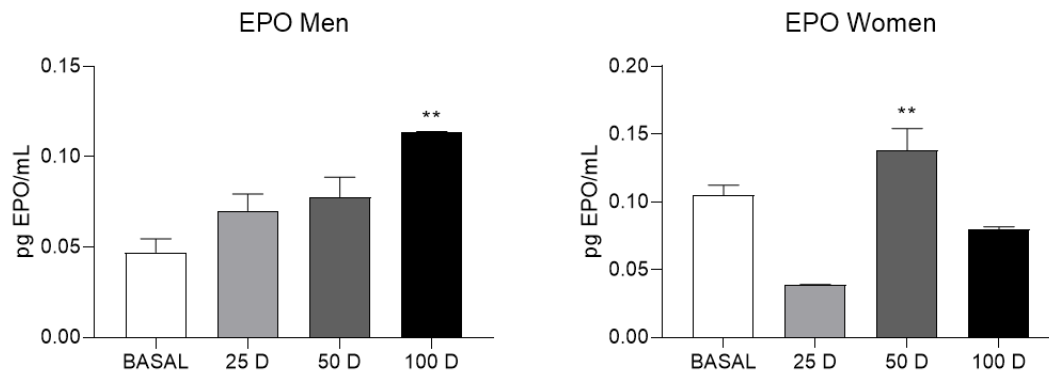




El VEGF y otras citocinas como el TNF- α intervienen en distintas etapas de la angiogenia, para incrementar la distribución de oxígeno celular y la glucólisis. Los resultados mantienen la equivalencia con el HIF siguiendo el mismo patrón en hombres y mujeres con incremento en tiempos cortos y reducción a 100 días. Los resultados por edades sin embargo solo muestra diferencias en menores de 60 años, lo que indica que la capacidad angiogénica esta reducida en los ancianos, lo cual es esperable.

Para mantener la homeostasis del oxígeno en los mamíferos adultos, cuando el riñón detecta hipoxia, segrega un factor de crecimiento eritroide, la eritropoyetina (EPO), que estimula la eritropoyesis en la médula ósea. La producción de EPO inducible por hipoxia, está controlada a nivel de transcripción génica principalmente por la vía del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF).





La EPO mantiene el patrón anterior con resultados distintos por sexos, pareciendo que las mujeres tienen un disparo de la producción de EPO ralentizada en comparación con los hombres. Aún no tenemos datos por distribución etaria.

Una respuesta fisiológica clásica a la hipoxia sistémica es el aumento de la producción de glóbulos rojos. Los factores inducibles por la hipoxia (HIF) orquestan esta respuesta induciendo cambios de expresión génica específicos del tipo de célula que dan lugar a un aumento de la producción de eritropoyetina (EPO) en el riñón y el hígado, a una mayor captación y utilización del hierro y a ajustes del microentorno de la médula ósea que facilitan la maduración y proliferación de los progenitores eritroides (Haase, 2013). Sin embargo, a nivel plasmático son las células sanguíneas las que producen el HIF-1 (y HIF-2 que aún no hemos estudiado pero que podría tener también alto interés) que inducirá también (además de riñón e hígado) la liberación de EPO a plasma. Nosotros en este trabajo hemos medido HIF-1 en eritrocitos pero pensamos ampliar el estudio al conjunto de células mononucleares de sangre periférica para incrementar la información sobre el caso. No podemos olvidar que estas células no solo recogen información de todo el organismo, sino que ellas mismas pueden ser específicamente activadoras de mecanismos de respuesta a hipoxia, pero también a inflamación y/o toxicidad (Regueira et al., 2009).

IMPORTANTE: Los datos obtenidos a nivel de las células nucleares de sangre periférica, por su capacidad de recoger información sistémica son habitualmente buenos marcadores de la situación general del individuo, si bien no son capaces de predecir ni detectar datos concretos de órganos específicos, cuyo interactoma debería ser estudiado de forma exclusiva.

REFERENCIAS

Gonzalez-Aquines A, Martínez-Roque D, Baltazar Trevino-Herrera A, Chavez-Luevanos BE, Guerrero-Campos F, Gongora-Rivera F. Síndrome de apnea obstructiva del sueño y su relación con el ictus isquémico [Obstructive sleep apnea syndrome and its relationship with ischaemic stroke]. *Rev Neurol.* 2019; 69:255-260.

Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013; 27:41-53.

Liu W, Zhang W, Wang T, Wu J, Zhong X, Gao K, Liu Y, He X, Zhou Y, Wang H, Zeng H. Obstructive sleep apnea syndrome promotes the progression of aortic dissection *via* a ROS- HIF-1 α -MMPs associated pathway. *Int J Biol Sci.* 2019; 15:2774-2782.

Maniaci A, Iannella G, Cocuzza S, Vicini C, Magliulo G, Ferlito S, Cammaroto G, Meccariello G, De Vito A, Nicolai A, Pace A, Artico M, Taurone S. Oxidative Stress and Inflammation Biomarker Expression in Obstructive Sleep Apnea Patients. *J Clin Med.* 2021; 10:277.

Montserrat JM, Hernández L, Nacher M, Barbé F. Nuevos aspectos patogénicos en el síndrome de apneas e hipopneas durante el sueño (SAHS) [New pathogenic features sleep apnea/hypopnea syndrome (SAHS)]. *Arch Bronconeumol.* 2004; 40 Suppl 6:27-34.

Regueira T, Andresen M, Djafarzadeh S. Disfunción mitocondrial en sepsis, impacto y posible papel regulador del factor inducible por hipoxia (HIF-1alpha) [Mitochondrial dysfunction during sepsis, impact and possible regulating role of hypoxia-inducible factor-1alpha]. *Med Intensiva.* 2009 Nov;33(8):385-92. Spanish. doi: 10.1016/j.medin.2008.10.002. Epub 2009 Sep 20. PMID: 19912970.

Firmado:

COTO
MONTES
ANA
MARIA -
10867988
M

Firmado
digitalmente por
COTO MONTES
ANA MARIA -
10867988M
Fecha:
2022.07.11 ®
10:53:24 +02'00'



Ana Coto Montes
Catedrática de Universidad
Investigadora Principal de cROS



Universidad de Oviedo

Grupo de Respuesta Celular al Estrés Oxidativo
Coordinador: Ana M^a Coto-Montes
Departamento de Morfología y Biología Celular
Facultad de Medicina
Universidad de Oviedo
Asturias. España. (Spain)
acoto@uniovi.es
Teléfonos: 34-985-3102779/5231
Fax: 34-985-103618



Resumen de los resultados

El mejor rendimiento celular se traduce en una mayor facilidad para el desarrollo de las actividades diarias. El gasto diario depende del esfuerzo del individuo, por ello estos resultados deben modularse por la opinión de los jugadores son los que realmente nos muestran los beneficios y justifiquen los resultados obtenidos que mostramos a continuación.

Estudio del efecto de BLOW sobre la capacidad mitocondrial y la síntesis de proteínas. Pilares del mejoramiento celular.

En el siguiente estudio se ha realizado en 9 jugadores de fútbol del Villarreal FC, que denominaremos de aquí en adelante como:

- Centrocampista A, Centrocampista B, Centrocampista C
- Defensa A, Defensa B
- Delantero A, Delantero B, Delantero C
- Portero

Se han realizado varias extracciones de sangre en los tiempos Basal, 72H, 15D, 23D y 34D. Con las muestras obtenidas se realizaron varios ensayos para determinar:

- La expresión de los complejos mitocondriales.
- La producción de ATP.
- La síntesis de proteínas.

1.- Expresión de los complejos mitocondriales

La mayor síntesis de ATP celular se alcanza a través de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria compuesto fundamentalmente por complejos multipéptidicos: Complejo I, Complejo II, Complejo III, Complejo IV, Complejo V.

El descenso de la expresión de los complejos mitocondriales a igual producción de ATP implica un mayor aprovechamiento mitocondrial.

Complejo I

Se observó un descenso en la expresión del complejo I:

- A las 72h en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 15D en el 56% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A.
- A los 23D en el 56% de los jugadores Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A.
- A los 34D en el 33% de los jugadores: Centrocampista B.

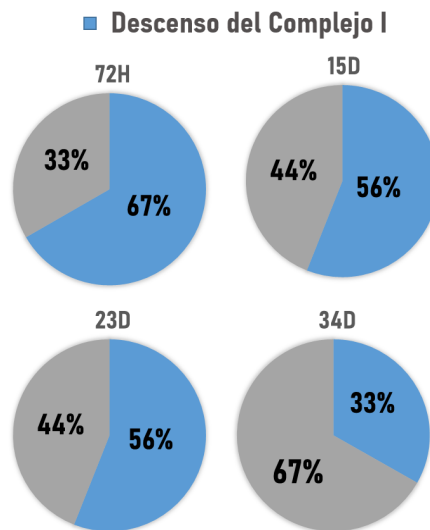


Figura 1: Desciende el Complejo I a las 72h en un 66,67% de los casos estudiados; A los 15D en un 55,56% de los casos estudiados; A los 23D en un 55,56% de los casos estudiados; A los 34D en un 33,33% de los casos estudiados.

Complejo II

Se observó un descenso en la expresión del complejo II:

- A las 72h en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 15D en el 100% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Portero, Centrocampista C, Delantero B, Delantero C.
- A los 23D en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Centrocampista C, Delantero B.
- A los 34D en el 33% de los jugadores: Centrocampista B.

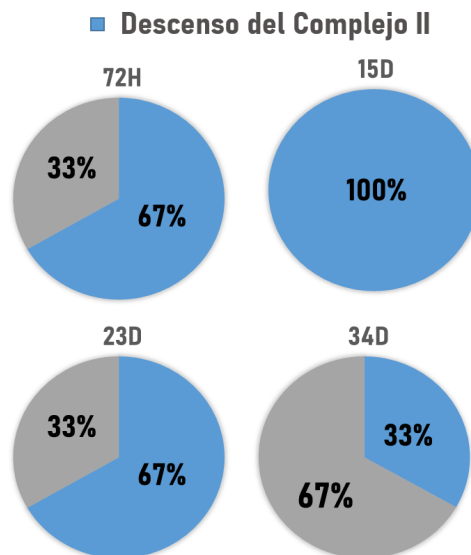


Figura 2: Desciende el Complejo II a las 72h en un 66,67% de los casos estudiados; A los 15D en un 100% de los casos estudiados; A los 23D en un 66,67% de los casos estudiados; A los 34D en un 33,33% de los casos estudiados.

Complejo III

Se observó un descenso en la expresión del complejo III:

- A las 72h en el 56% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 15D en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Portero, Centrocampista C.
- A los 23D en el 67% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Centrocampista C, Delantero B.
- A los 34D en el 33% de los jugadores: Centrocampista B.

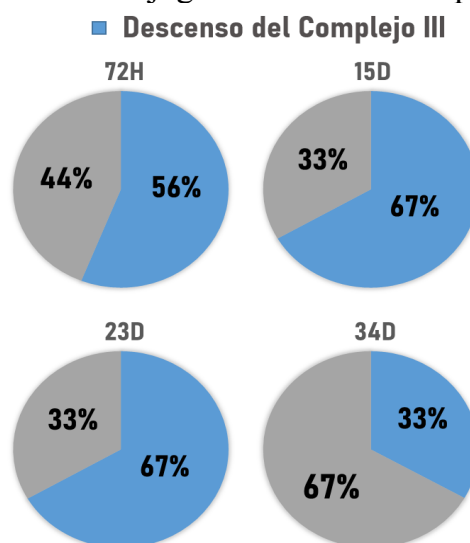


Figura 3: Desciende el Complejo III a las 72h en un 55,56% de los casos estudiados; A los 15D en un 66,67% de los casos estudiados; A los 23D en un 66,67% de los casos estudiados; A los 34D en un 33,33% de los casos estudiados.

Complejo IV

Se observó un descenso en la expresión del complejo IV:

- A las 72h en el 77% de los jugadores: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Portero, Centrocampista C.
- A los 15D en el 44% de los jugadores: Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Centrocampista C.
- A los 23D en el 33% de los jugadores: Defensa A, Defensa B, Delantero A.
- A los 34D en el 67% de los jugadores: Centrocampista B, Delantero A.

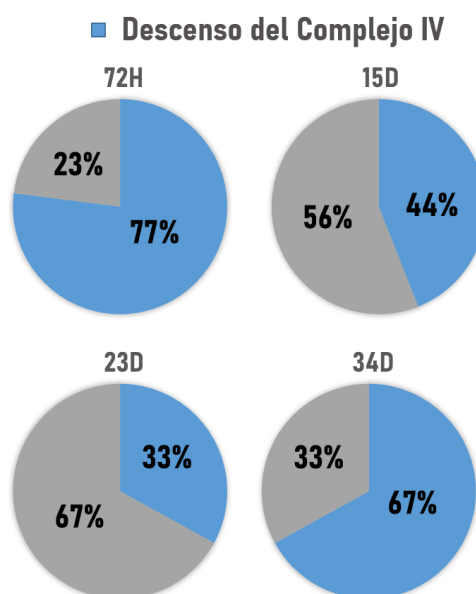


Figura 4: Desciende el Complejo III a las 72h en un 77,78% de los casos estudiados; A los 15D en un 44,44% de los casos estudiados; A los 23D en un 33,33% de los casos estudiados; A los 34D en un 66,67% de los casos estudiados.

Complejo V

- A las 72h en un 56% de los jugadores Centrocampista A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 15D en un 44% de los jugadores Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C.
- A los 23D en un 67% de los jugadores Centrocampista A, Defensa B, Centrocampista B, Delantero A, Centrocampista C, Delantero B.
- A los 34D en un 67% de los jugadores Centrocampista B, Delantero A.

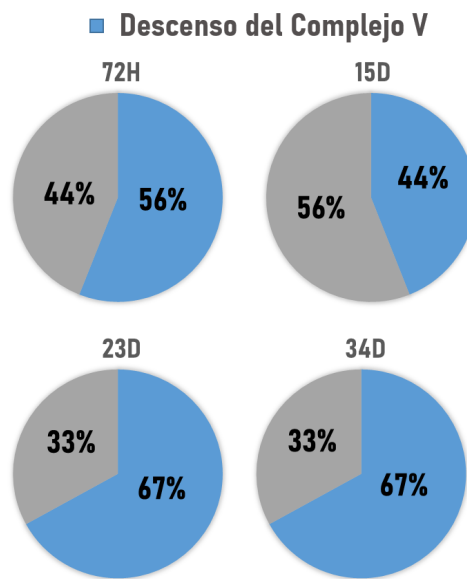


Figura 5: Desciende el Complejo III a las 72h en un 55,56% de los casos estudiados; A los 15D en un 44,44% de los casos estudiados; A los 23D en un 66,67% de los casos estudiados; A los 34D en un 66,67% de los casos estudiados .

2.- Producción de ATP

El ATP que medimos necesariamente es el que resta después de que el ATP total se le descuenta el ATP gastado en las actividades diarias. Por tanto, una disminución de la concentración de ATP no implica necesariamente una menor producción de ATP, sino que puede contar con una mayor capacidad de gasto energético que el jugador puede aprovechar en cada juego.

Se observó un aumento de la concentración de ATP después de jugar un partido en la mayoría de los casos: Centrocampista A, Defensa A, Defensa B, Centrocampista B, Portero, Delantero C.

Sin embargo, en el Centrocampista A y el Delantero B no ocurre lo esperado sino que por sus características propias individuales la concentración de ATP después de jugar un partido disminuye.

Centrocampista A

Juega 3 partidos en el periodo en el que se realiza el estudio:

- 1 partido previo a de la extracción 72H
- 2 partidos previo a la extracción 23D

En el periodo 72H – 15D no juega ningún partido.

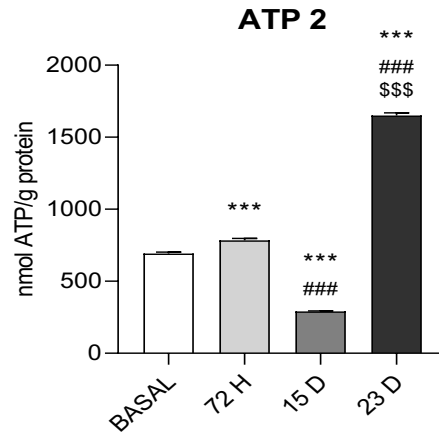


Figura 6: Niveles de ATP en el jugador “Centrocampista A”

Defensa A

4 días antes de la extracción 15D se lesiona y no juega ningún partido más en este periodo, en el que la concentración de ATP disminuye a una mayor velocidad.

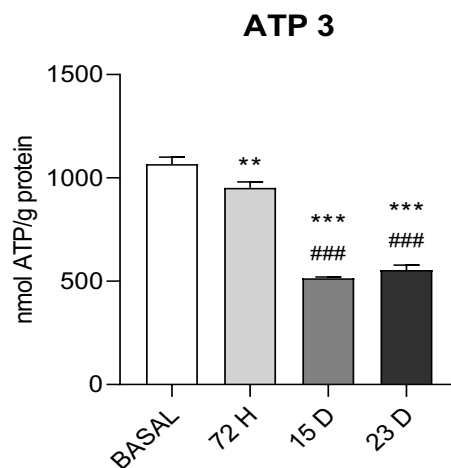


Figura 8: Niveles de ATP en el jugador “Defensa A”

Defensa B

Lesionado de larga duración que recibe el alta médica 1 mes antes de la extracción basal, el ATP disminuye a las 72H y los 15D ya que en ese periodo no juega ningún partido.

Juega antes de la extracción 23D.

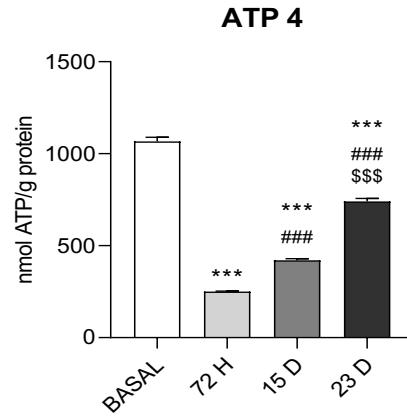


Figura 9: Niveles de ATP en el jugador “Defensa B”

Centrocampista B

Esta lesionado y no juega ningún partido, se observa como la cantidad de ATP va disminuyendo a lo largo del tiempo.

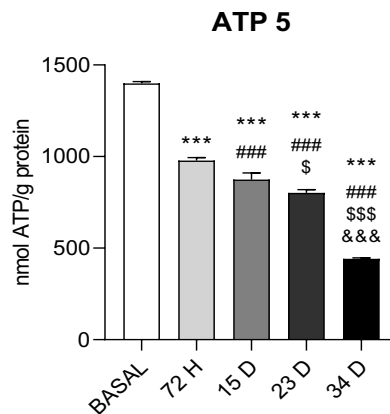


Figura 10: Niveles de ATP en el jugador “Defensa B”

Portero

Juega 3 partidos en el periodo en el que se realiza el estudio:

- 1 partido previo a de la extracción 72H
- 1 partido previo a la extracción 23D
- 1 partido previo a la extracción 34D

En el periodo 72H – 15D no juega ningún partido.

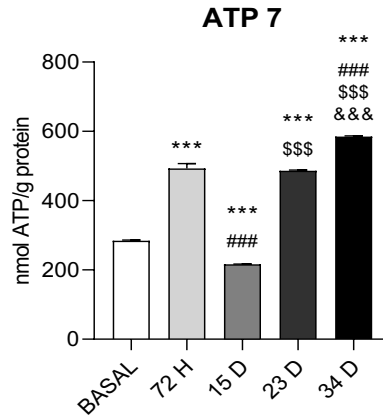


Figura 11: Niveles de ATP en el jugador “Defensa B”

Delantero C

Juega 4 partidos en el periodo en el que se realiza el estudio:

- 1 partido previo a de la extracción 72H
- 1 partido previo a la extracción 15D
- 2 partidos previo a la extracción 23D

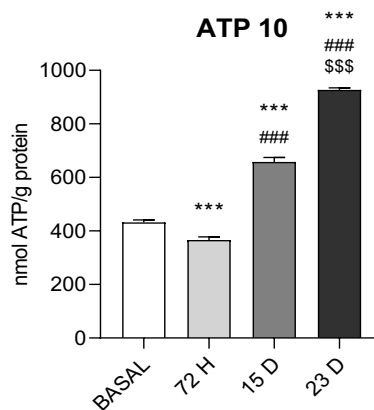


Figura 12: Niveles de ATP en el jugador “Delantero C”

3.- Síntesis de proteínas

El Centrocampista B es un lesionado de larga duración que no juega ningún partido, sigue una tendencia ascendente en la síntesis de proteínas.

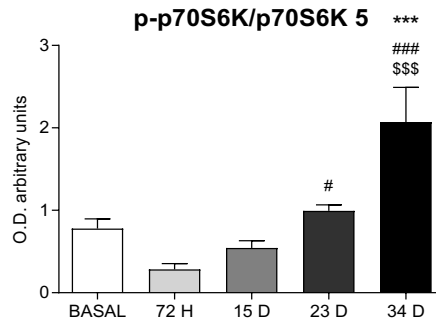


Figura 13: p-p70S6K/p70S6K en el jugador “Centrocampista B”

El Defensa A tiene una lesión previa a la extracción 15D, observamos que en ese momento la síntesis de proteínas aumenta.

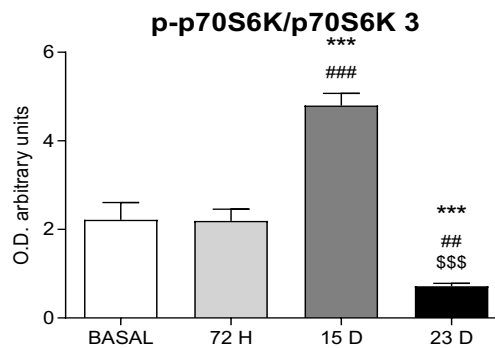


Figura 14: p-p70S6K/p70S6K en el jugador “Defensa A”

En cambio, en el resto de los jugadores observamos variabilidad, serían necesarios datos adicionales sobre lesiones, molestias musculares, horas jugadas, intensidad de los entrenamientos y descansos para poder perfilar estos resultados.

Se observó un incremento de la síntesis de proteínas:

- A las 72h en el 44% de los jugadores: Centrocampista A, Portero, Delantero B, Delantero C
- A los 15D en el 44% de los jugadores: Defensa A, Centrocampista C, Delantero B, Delantero C
- A los 23D en el 56% de los jugadores: Centrocampista B, Portero, Centrocampista C, Delantero B, Delantero C.
- A los 34D en el 67% de los jugadores: Centrocampista B, Delantero A.

■ Incremento de la síntesis de proteínas

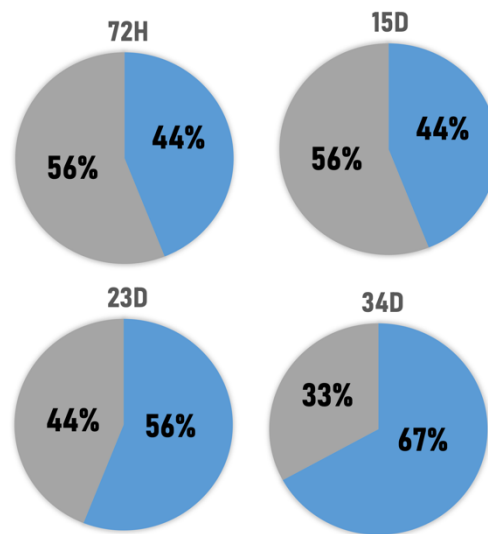


Figura 13: Aumenta la síntesis de proteínas a las 72h en un 44,44% de los casos estudiados; A los 15D en un 44,44% de los casos estudiados; A los 23D en un 55,56% de los casos estudiados; A los 34D en un 66,67% de los casos estudiados.

TNF-a

		Total	Hombres	Mujeres	Mayores	Menores
Significativamente	Sube	11/26=42,3%	4/12=33,3%	7/14=50%	5/10=50%	6/16=37,5%
	Baja	0/26=0%	0/12=0%	0/12=0%	0/10=0%	0/16=0%
	Se mantiene	15/26=57,7%	8/12=66,7%	7/14=50%	5/10=50%	10/16=62,5%
Tendencia	Sube	14/26=53,84%	6/12=50%	8/14=57,1%	5/10=50%	9/16=56,25%
	Baja	5/26=19,23%	4/12=33,3%	1/14=7,2%	2/10=20%	3/16=18,75%
	Se mantiene	7/26=26,92%	2/12=16,7%	5/14=35,7%	3/10=30%	4/16=25%

IL-6

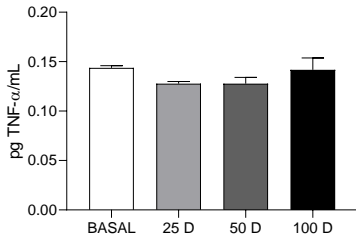
		Total	Hombres	Mujeres	Mayores	Menores
Significativamente	Sube	2/26=7,7%	1/12=8,33%	1/14=7,1%	1/10=10%	1/16=6,25%
	Baja	2/26=7,7%	1/12=8,33%	1/14=7,1%	1/10=10%	1/16=6,25%
	Se mantiene	22/26=84,6%	10/12=83,33%	12/14=85,8%	8/10=80%	14/16=87,5%
Tendencia	Sube	8/26=30,8%	4/12=33,3%	4/14=28,6%	3/10=30%	5/16=31,25%
	Baja	10/26=38,4%	4/12=33,3%	6/14=42,8%	5/10=50%	5/16=31,25%
	Se mantiene	8/26=30,8%	4/12=33,3%	4/14=28,6%	2/10=20%	6/16=37,5%

TNF- α

Gijón 2020

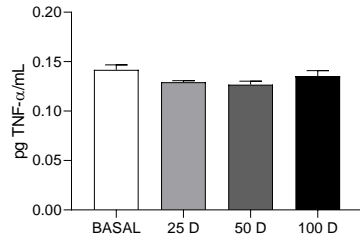
1
Mujer 46 años

TNF- α 1



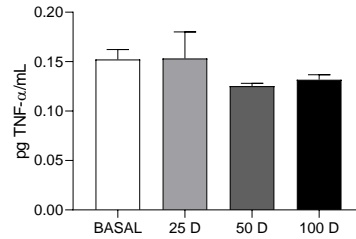
2
Hombre 52 años

TNF- α 2



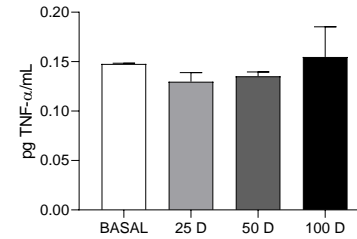
3
Hombre 52 años

TNF- α 3



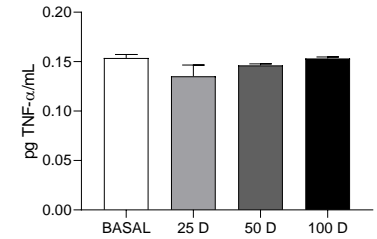
4
Mujer 49 años

TNF- α 4



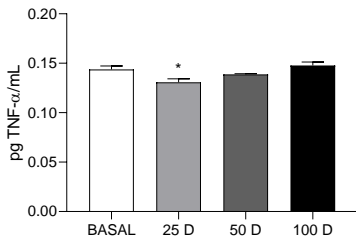
5
Mujer 69 años

TNF- α 5



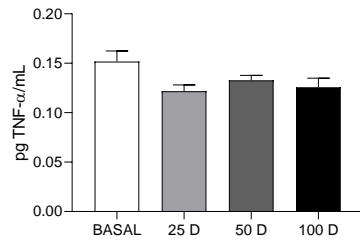
6
Hombre 70 años

TNF- α 6



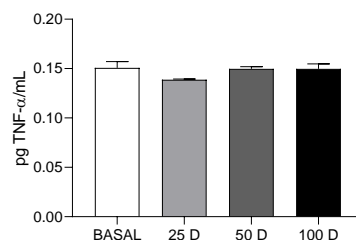
7
Mujer 65 años

TNF- α 7



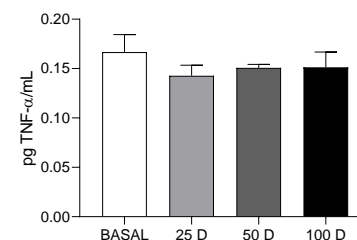
8
Hombre 66 años

TNF- α 8



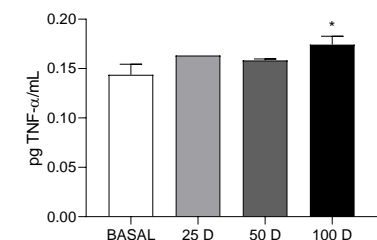
9
Hombre 60 años

TNF- α 9



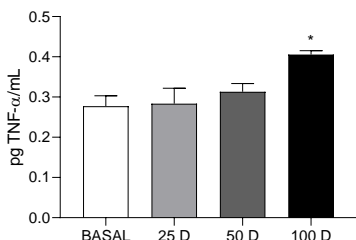
10
Mujer 60 años

TNF- α 10



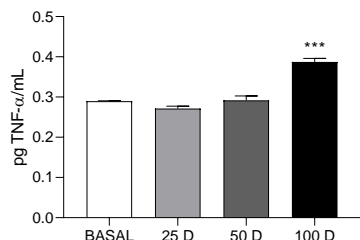
11
Hombre 33 años

TNF- α 11



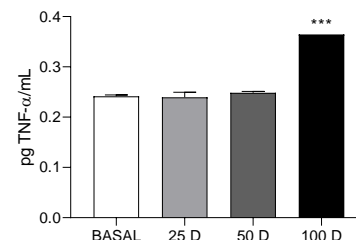
12
Hombre 61 años

TNF- α 12



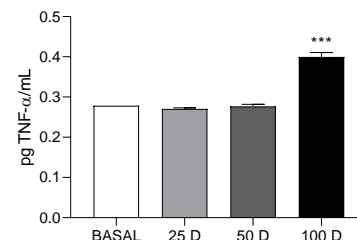
13
Mujer 58 años

TNF- α 13



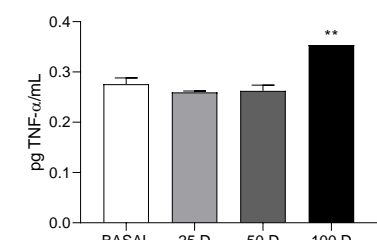
14
Hombre 43 años

TNF- α 14



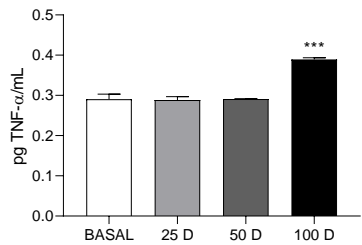
15
Mujer 39 años

TNF- α 15

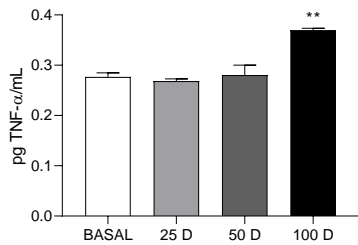


16**Mujer 68 años**

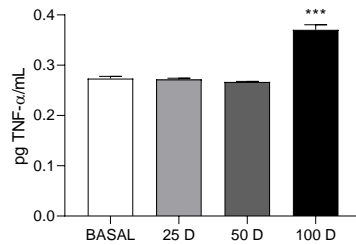
TNF-a 16

**17****Hombre 68 años**

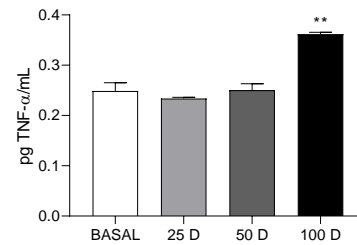
TNF-a 17

**18****Mujer 68 años**

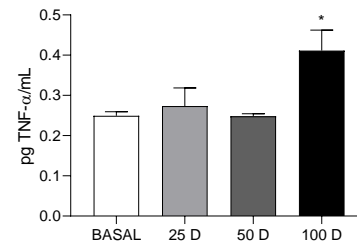
TNF-a 18

**20****Mujer 32 años**

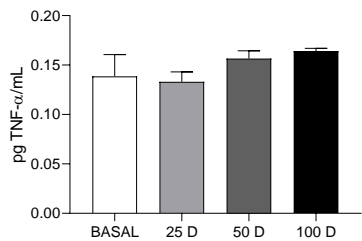
TNF-a 20

**21****Mujer 53 años**

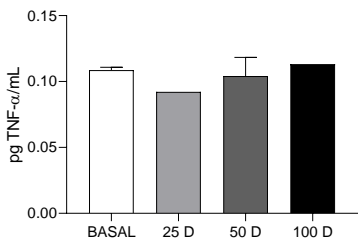
TNF-a 21

**22****Hombre 53 años**

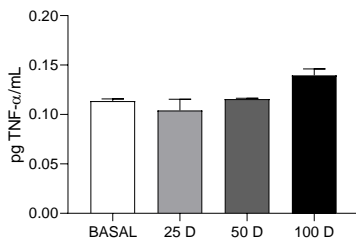
TNF-a 22

**23****Mujer 42 años**

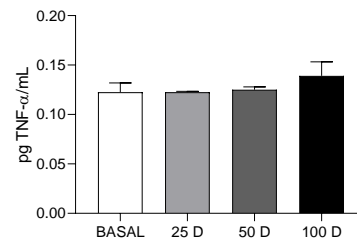
TNF-a 23

**24****Hombre 43 años**

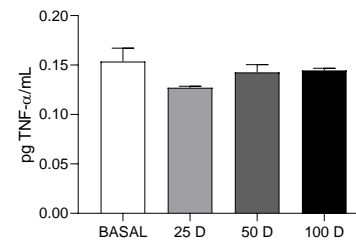
TNF-a 24

**25****Mujer 40 años**

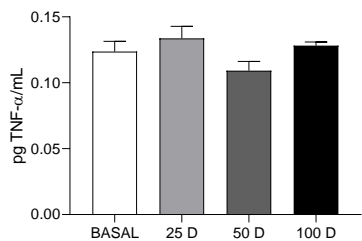
TNF-a 25

**26****Hombre 48 años**

TNF-a 26

**27****Mujer 22 años**

TNF-a 27



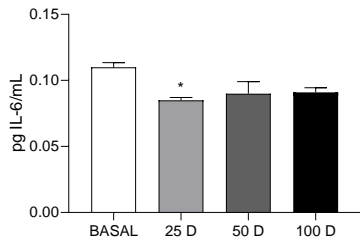
* El individuo 19 abandonó el estudio

IL-6

Gijón 2020

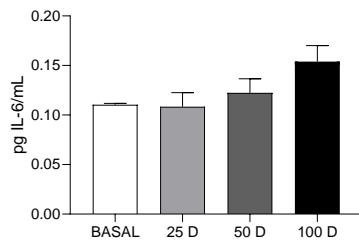
1
Mujer 46 años

IL-6 1



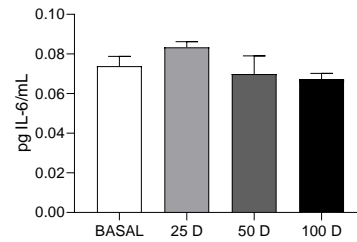
2
Hombre 52 años

IL-6 2



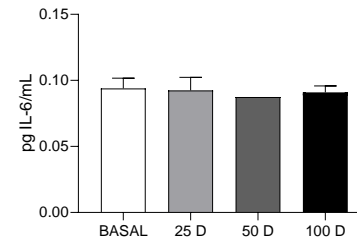
3
Hombre 52 años

IL-6 3



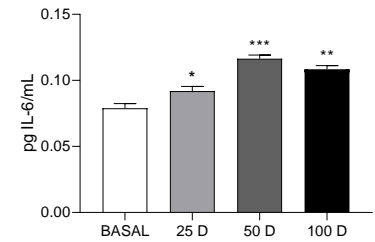
4
Mujer 49 años

IL-6 4



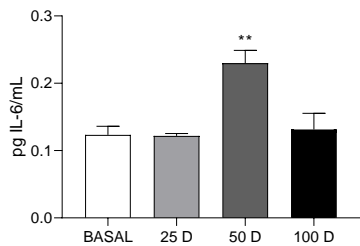
5
Mujer 69 años

IL-6 5



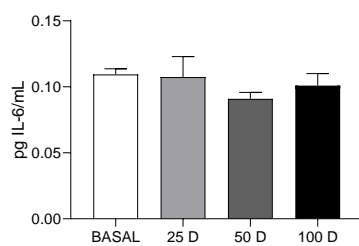
6
Hombre 70 años

IL-6 6



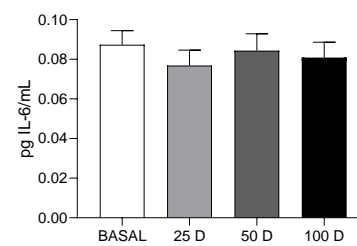
7
Mujer 65 años

IL-6 7



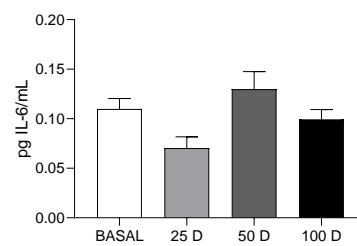
8
Hombre 66 años

IL-6 8



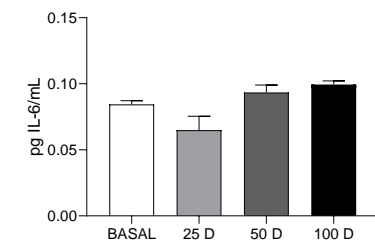
9
Hombre 60 años

IL-6 9



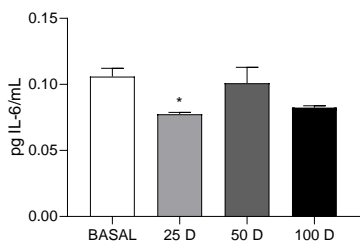
10
Mujer 60 años

IL-6 10



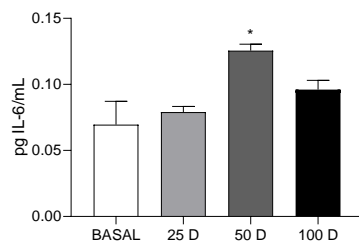
11
Hombre 33 años

IL-6 11



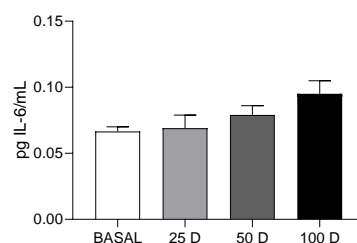
12
Hombre 61 años

IL-6 12



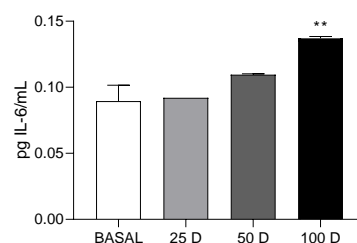
13
Mujer 58 años

IL-6 13



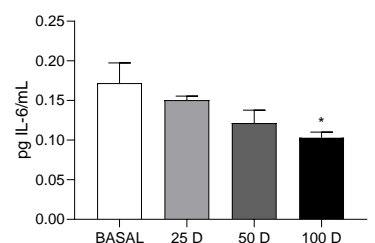
14
Hombre 43 años

IL-6 14



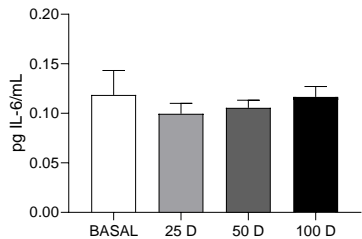
15
Mujer 39 años

IL-6 15

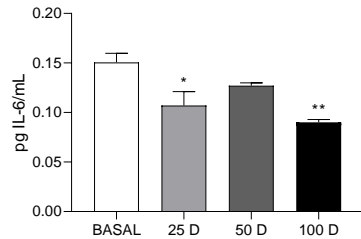


16**Mujer 68 años**

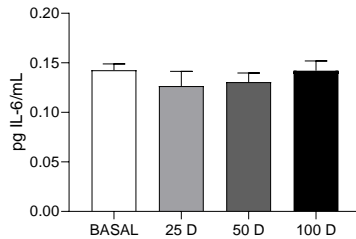
IL-6 16

**17****Hombre 68 años**

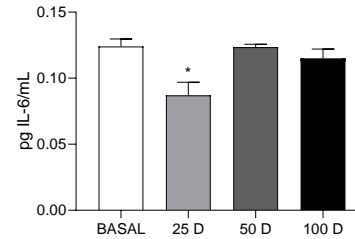
IL-6 17

**18****Mujer 68 años**

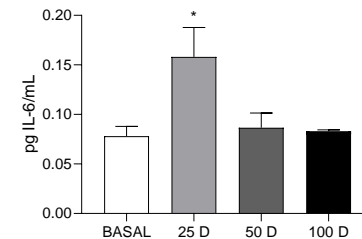
IL-6 18

**20****Mujer 32 años**

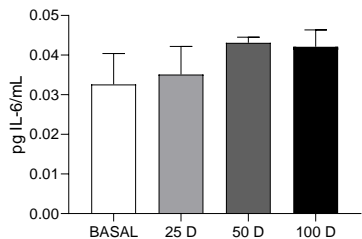
IL-6 20

**21****Mujer 53 años**

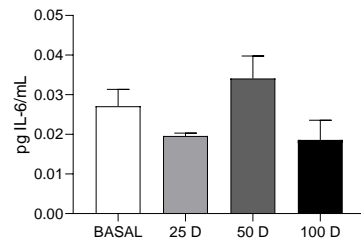
IL-6 21

**22****Hombre 53 años**

IL-6 22

**23****Mujer 42 años**

IL-6 23

**24****Hombre 43 años**

Basal IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 25 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 50 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 100 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE

25**Mujer 40 años**

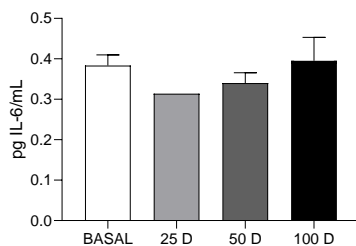
Basal IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 25 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 50 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 100 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE

26**Hombre 48 años**

Basal IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 25 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 50 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE
 100 D IL-6 < 2 pg/mL = INDETECTABLE

27**Mujer 22 años**

IL-6 27

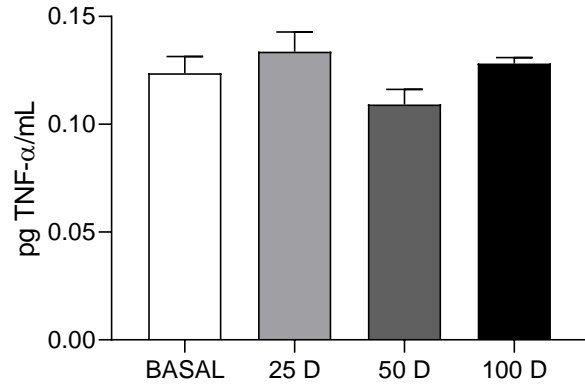


* El individuo 19 abandonó el estudio

TNF-a

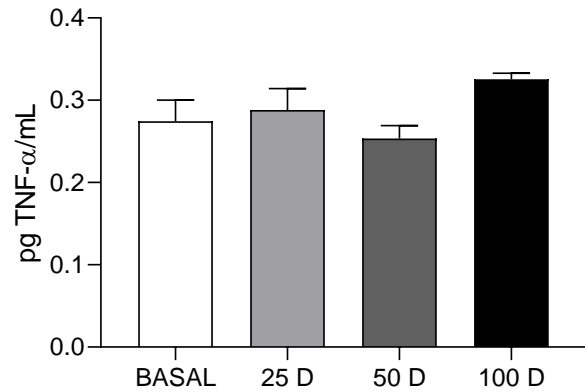
Asmático Gijón 2020

27
Mujer 22 años
TNF-a 27

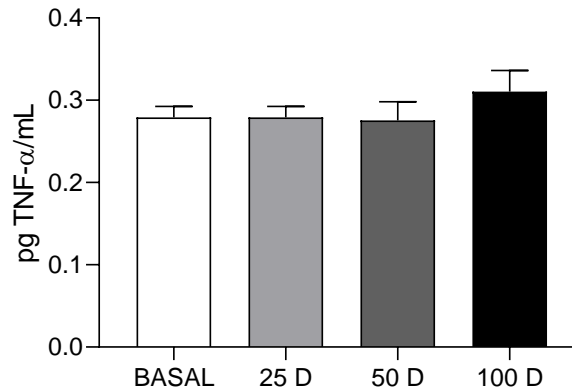


Asmáticos Gijón 2021

1.7
Hombre 35 años
TNF-a 1.7

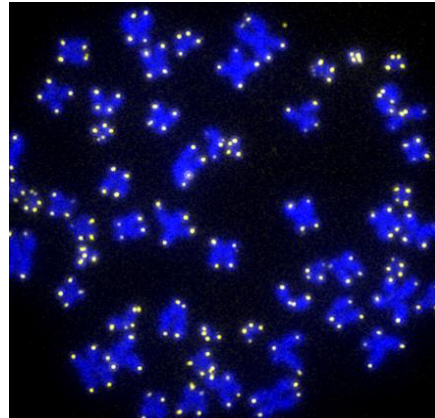
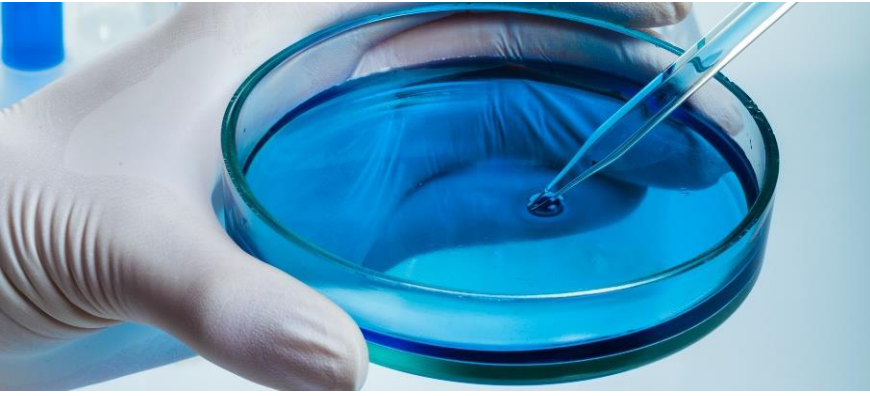


4.8
Hombre 61 años
TNF-a 4.8





LIFE LENGTH



STUDY REPORT

bio:w



LIFE LENGTH

Telomere length (TAT[®]) analysis for Biow

Table of Contents

- OBJECTIVE** 1
- 1. TELOMERE LENGTH MEASUREMENTS BY TELOMERE ANALYSIS TECHNOLOGY (TAT[®])** 1
 - 1.1. TECHNIQUE OVERVIEW 1
 - 1.2. TECHNOLOGY VALIDATION 2
- 2. RESULTS**..... 3
 - 2.1. QUALITY CONTROL PARAMETERS 3
 - Cell count and viability results*..... 3
- 3. RESULTS AND DATA ANALYSIS** 5
 - 3.1. TAT ASSAY RESULTS..... 5
 - Representative TAT image*..... 8
 - Extended Telomere Associated Variables (TAVs) analysis*..... 9
- 4. OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS** 18
- 5. REFERENCES** 19

OBJECTIVE

Determination of telomere length by TAT analysis in blood samples provided by Biow.

1. TELOMERE LENGTH MEASUREMENTS BY TELOMERE ANALYSIS TECHNOLOGY (TAT®)

1.1. TECHNIQUE OVERVIEW

For the measurement of the median telomere length of any cell line, Life Length (LL) uses a high-throughput (HT) Q-FISH technique. This method is based on a quantitative fluorescence *in-situ* hybridization method modified for cells in interphase. In brief, telomeres are hybridized with a fluorescent Peptide Nucleic Acid probe (PNA) that recognizes three telomere repeats (sequence: Alexa488-OO-CCCTAACCTAACCTAA, Panagene). The images of the nuclei and telomeres are captured by a high-content screen system (see below). The intensity of the fluorescent signal from the telomeric PNA probes that hybridize to a given telomere is proportional to the length of that telomere. The intensities of fluorescence are translated to base pairs through a standard regression curve which is generated using control cell lines with known telomere length.

Sample Preparation and HT Q-FISH: On processing day, the samples and control cell lines frozen in liquid nitrogen are thawed at 37°C and cell counts and cellular viability are determined. Aliquots with viability lower than 60% are considered below our QC standards and are not further analyzed. Cells are seeded in clear bottom black-walled 384-well plates at the density of 35,000 cells per well with 5 replicates of each sample and 8 replicates of each control cell line. Two identical independent plates are prepared for each set of samples. Cells are fixed with methanol/acetic acid (3/1, vol/vol). Once the cells have been fixed onto the plate, they are treated with pepsin to digest the cytoplasm and the nuclei are processed for *in situ* hybridization with the PNA probe. After several washing steps following standard DAPI incubation for DNA staining, the wells are filled up with mounting medium and the plate is stored overnight at 4°C.

HT Microscopy: Quantitative image acquisition and analysis is performed on a High Content Screening Opera System (Perkin Elmer), using the Acapella software, Version 1.8 (Perkin Elmer). Images are captured, using a 40 x 0.95 water immersion objective. UV and 488 nm excitation wavelengths are used to detect the DAPI and A488 signals respectively. With constant exposure settings, 15 independent images are captured at different positions for each well. Next, the nuclei images are used to define the region of interest for each cell, measuring telomere fluorescence intensity of the A488 image in all of them. The results of intensity for each foci are exported to the Columbus 2.4 software (Perkin Elmer). Telomere length distribution and median telomere length are calculated with Life Length's proprietary program.

1.2. TECHNOLOGY VALIDATION

The TAT technology has been validated for the following parameters using human blood samples:

Accuracy: The establishment of a correspondence between TAT fluorescence intensity values and telomere length measurements is achieved by performing TRF (Terminal Restriction Fragmentation) in six human lymphocyte cell lines (Calibration / Method Comparison). The same set of samples is analyzed both by TAT and by the TRF reference method (Definition of TAT Systemic Error).

VALIDATION DATA shows a correlation of 0.99.

Precision: Serial analysis of the median telomere length values is performed on a human lymphocyte sample in different runs, days and plate positions in order to define TAT Random Error parameters (Standard Deviation, Variance).

VALIDATION DATA indicates that TAT has a standard deviation of 454 base pairs.

Limit of Detection and Specificity: Definition of image analysis algorithms and protocol settings exist that define the lowest significant spot intensities and avoid interference by nonspecific fluorescence signals.

VALIDATION DATA defines the limit of detection at 800 base pairs and demonstrates very high specificity.

Median Reportable Range: Analysis of median telomere length of 6 cell lines is performed that covers our reportable range and defines its lower and upper limits.

VALIDATION DATA fix lower level at 4,700 base pairs and upper level at 14,400 base pairs.

Reference Range: Analysis of median telomere length have been conducted in hundreds of human samples in order to define the TAT Reference Range and its percentiles (5th, 10th, 25th, 50th, 75th and 95th) for different ages.

VALIDATION DATA established population curves - normal population data base from 18 to 85 years, to extrapolate patients' data and generate reports.

2. RESULTS

In order to perform the measurements in the samples provided, the fresh blood samples were processed according to Life Length's Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) isolation protocol and the cells were prepared in single cell suspensions appropriate for the analysis.

2.1. QUALITY CONTROL PARAMETERS

Previous to plating and before conducting the TAT protocol, the samples were assessed for:

- Cell count: An automated cell counter is used to determine the total number of cells in the vials. A minimum of 8.75×10^5 cells are needed to perform TAT.
- Cell viability by Tripan-Blue exclusion method. The exclusion criteria currently in place will reject aliquots with less than 60% viable cells.
- Regression Curve: Internal controls are included and a regression analysis is performed for each run/plate. The plates are repeated if their regression curves have an R^2 below 0.92.
- Replicates: After seeding and once TAT is completed:
 - Samples with CV above 10% are discarded.
 - Samples with less than 3 valid replicates at the end of the analysis are discarded.
 - Spot number analyzed per sample should be higher than 10,000.

Cell count and viability results

Table 1: Concentration and viability of samples after thawing.

Life Length ID	Client ID	Viability %	Cell Concentration ($\times 10^6$ cell/mL)
LLCR034001	T01-B1	92	2.5
LLCR034002	T02-B1	86	2.5
LLCR034003	T03-B1	84	2.8
LLCR034004	T04-B1	82	4
LLCR034005	T05-B1	91	2.2
LLCR034006	T06-B1	84	2.8
LLCR034007	T07-B1	81	3.2
LLCR034008	T08-B1	91	2.7
LLCR034009	T09-B1	86	1.8
LLCR034010	T10-B1	86	3.2
LLCR034011	T11-B1	88	3.8
LLCR034012	T12-B1	85	3.1
LLCR034013	T01-B2	94	2.5
LLCR034014	T02-B2	89	3.5
LLCR034015	T03-B2	76	3.3
LLCR034016	T04-B2	92	2.3
LLCR034017	T05-B2	87	3.2
LLCR034018	T06-B2	84	2.5

LLCR034019	T07-B2	96	3.3
LLCR034020	T08-B2	90	3.2
LLCR034021	T09-B2	83	3.1
LLCR034022	T10-B2	90	3.7
LLCR034023	T11-B2	92	3.1
LLCR034024	T12-B2	83	3.3
LLCR034025	T01-B3	90	2.5
LLCR034026	T02-B3	90	2.4
LLCR034027	T03-B3	86	2.8
LLCR034028	T04-B3	89	4
LLCR034029	T05-B3	93	3
LLCR034030	T06-B3	80	3.9
LLCR034031	T07-B3	94	3.6
LLCR034032	T08-B3	92	3.6
LLCR034033	T09-B3	82	3.6
LLCR034034	T10-B3	94	2.9

All samples meet the quality control parameters after thawing.

3. RESULTS AND DATA ANALYSIS

3.1. TAT ASSAY RESULTS

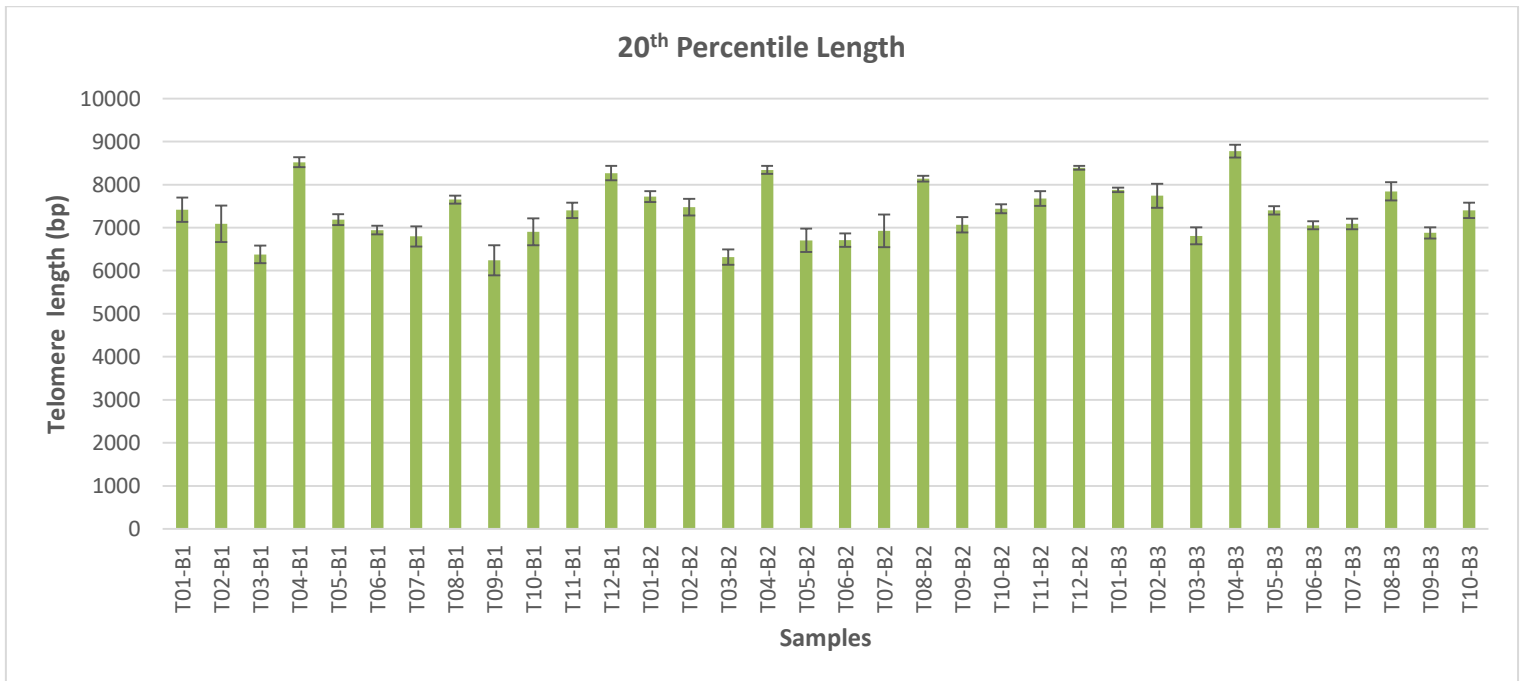
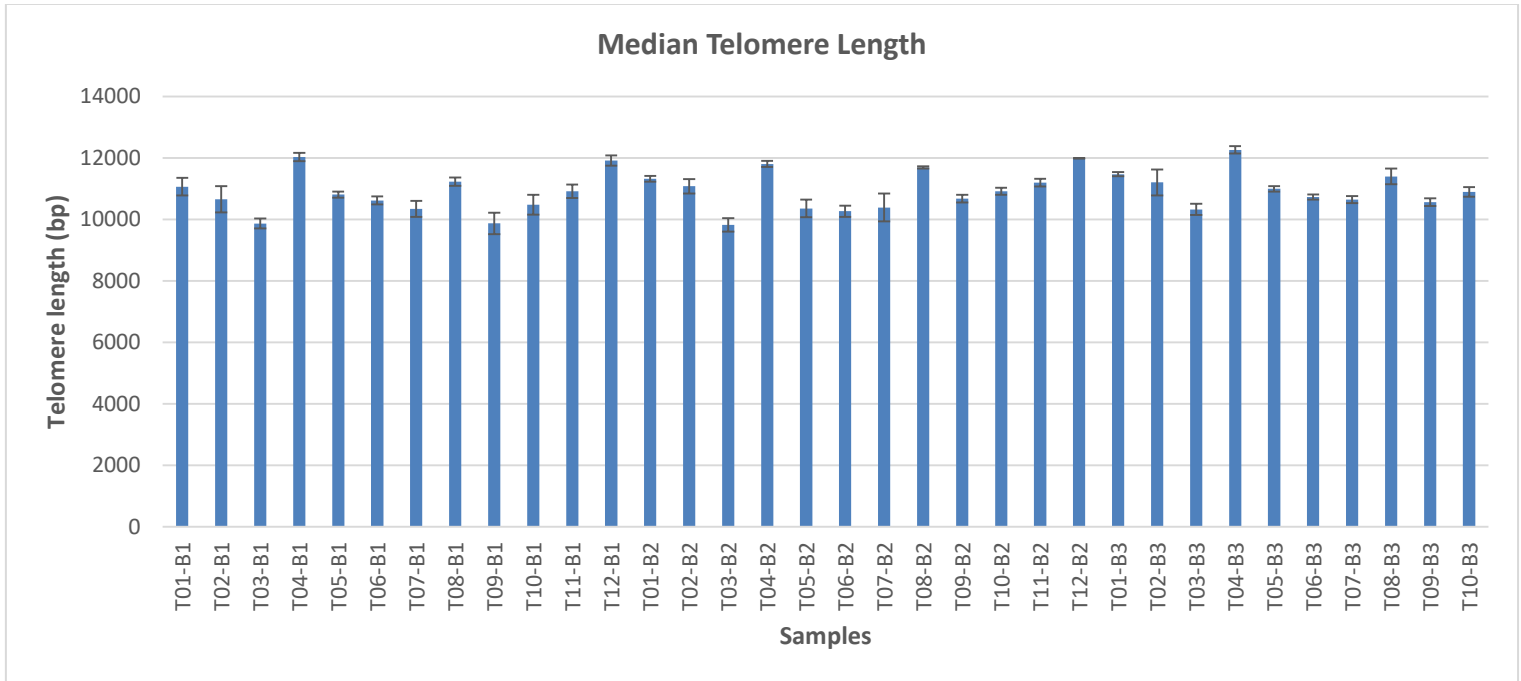
The following table shows the median telomere length (MTL) and 20th percentile telomere length (both in base pairs - bp) for each sample as well as the percentage of short telomeres. The latter is defined as the percentage of the telomeres with a length below 3 Kbp (<3 Kbp). All measurements were performed in quintuplicates.

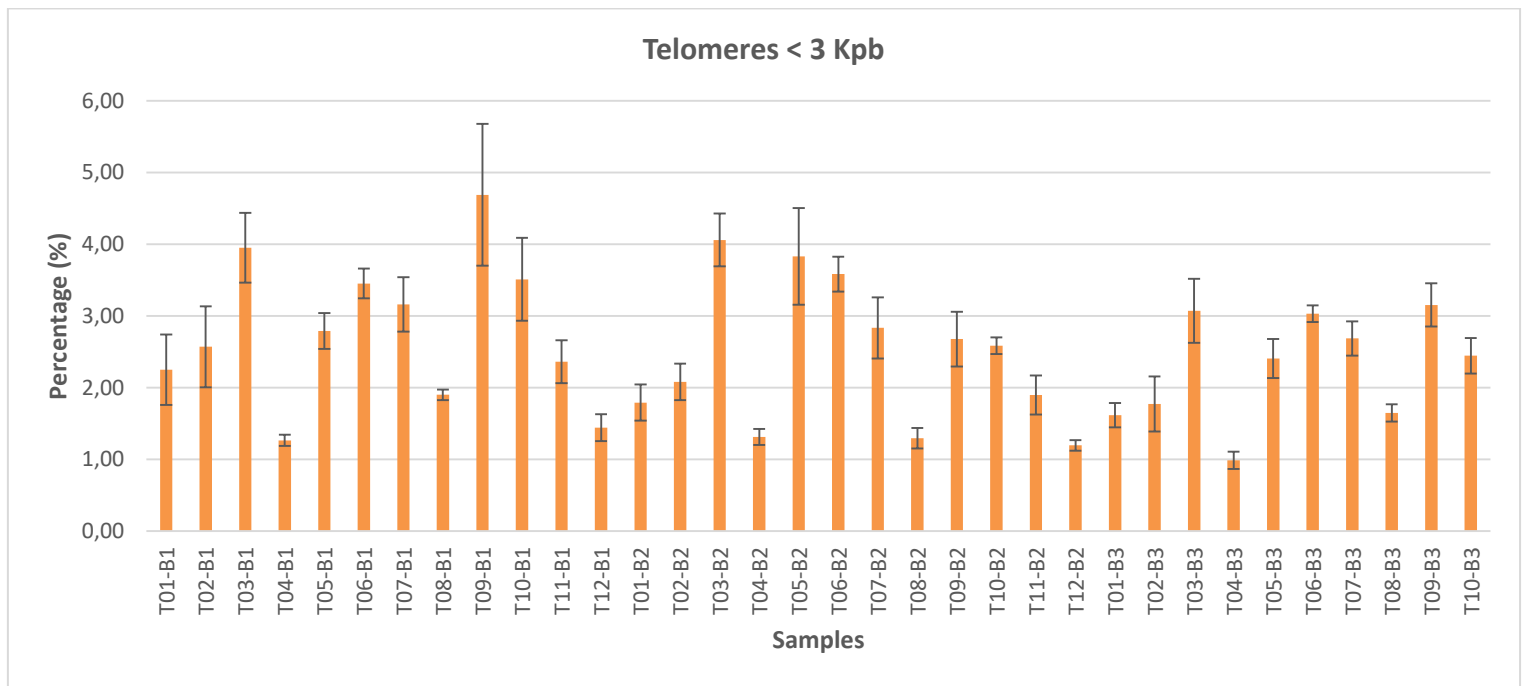
Table 3. Telomere length results from TAT analysis.

Life Length ID	Client ID	Median Telomere Length (bp)	20 th Percentile Length (bp)	Telomeres < 3 Kbp (%)	CV (%)
LLCR034001	T01-B1	11063	7414	2.25	2.61
LLCR034002	T02-B1	10655	7090	2.57	3.97
LLCR034003	T03-B1	9866	6377	3.95	1.64
LLCR034004	T04-B1	12028	8520	1.27	1.15
LLCR034005	T05-B1	10805	7186	2.79	0.91
LLCR034006	T06-B1	10616	6944	3.45	1.25
LLCR034007	T07-B1	10345	6797	3.16	2.54
LLCR034008	T08-B1	11227	7651	1.90	1.19
LLCR034009	T09-B1	9870	6243	4.69	3.55
LLCR034010	T10-B1	10482	6905	3.51	3.08
LLCR034011	T11-B1	10915	7403	2.36	2.04
LLCR034012	T12-B1	11917	8268	1.44	1.37
LLCR034013	T01-B2	11325	7723	1.79	0.83
LLCR034014	T02-B2	11079	7478	2.08	2.10
LLCR034015	T03-B2	9819	6316	4.06	2.25
LLCR034016	T04-B2	11801	8342	1.31	0.83
LLCR034017	T05-B2	10357	6706	3.83	2.75
LLCR034018	T06-B2	10264	6711	3.58	1.81
LLCR034019	T07-B2	10387	6925	2.83	4.33
LLCR034020	T08-B2	11690	8140	1.29	0.28
LLCR034021	T09-B2	10678	7064	2.68	1.18
LLCR034022	T10-B2	10911	7440	2.59	1.05
LLCR034023	T11-B2	11196	7679	1.90	1.11
LLCR034024	T12-B2	11984	8390	1.19	0.10
LLCR034025	T01-B3	11471	7878	1.62	0.61
LLCR034026	T02-B3	11204	7742	1.77	3.75
LLCR034027	T03-B3	10323	6809	3.07	1.77
LLCR034028	T04-B3	12263	8777	0.99	1.01
LLCR034029	T05-B3	10993	7402	2.41	0.82
LLCR034030	T06-B3	10724	7055	3.03	0.79
LLCR034031	T07-B3	10640	7087	2.69	1.09
LLCR034032	T08-B3	11396	7844	1.65	2.23

LLCR034033	T09-B3	10561	6880	3.15	1.19
LLCR034034	T10-B3	10894	7400	2.45	1.48

Figure 1. Bar charts of TAT results (Median Telomere Length, 20th Percentile Telomere Length and % Short Telomeres).

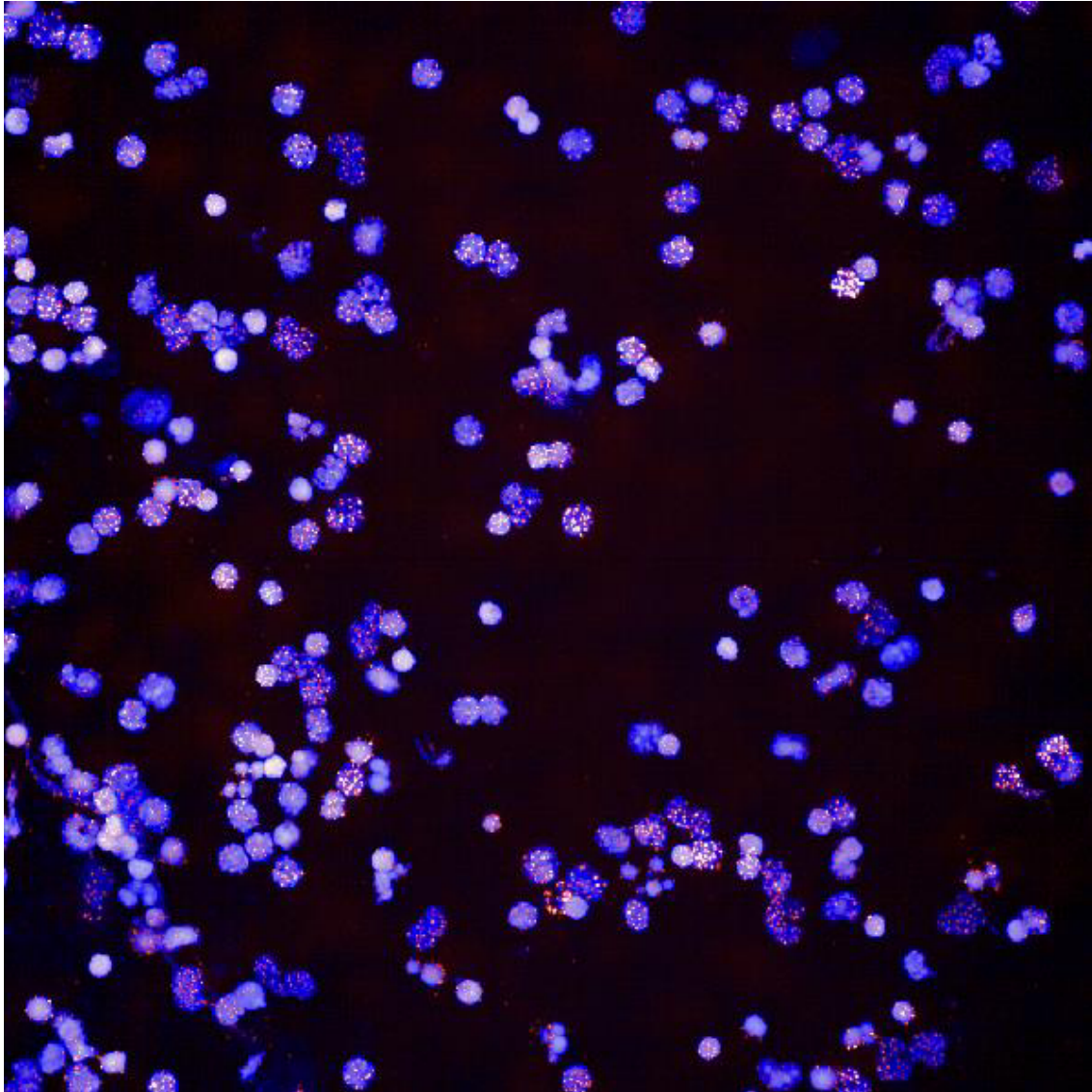




A statistical analysis of the results is included in the separate excel file provided with this report.

Representative TAT image

Figure 2. Representative image of TAT. Both nuclei (blue) and telomeric spots (green) of each sample can be seen in the photo below.

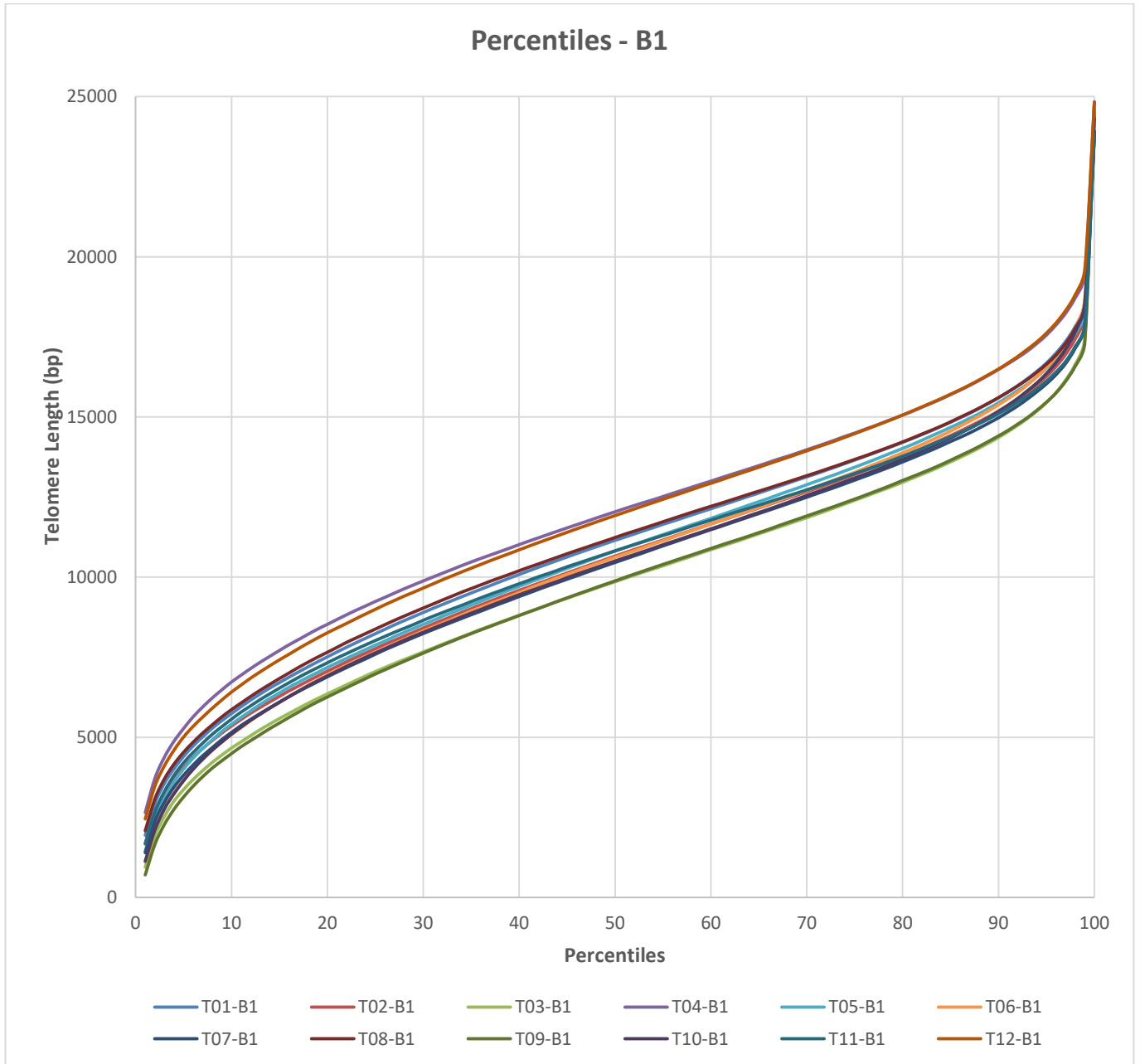


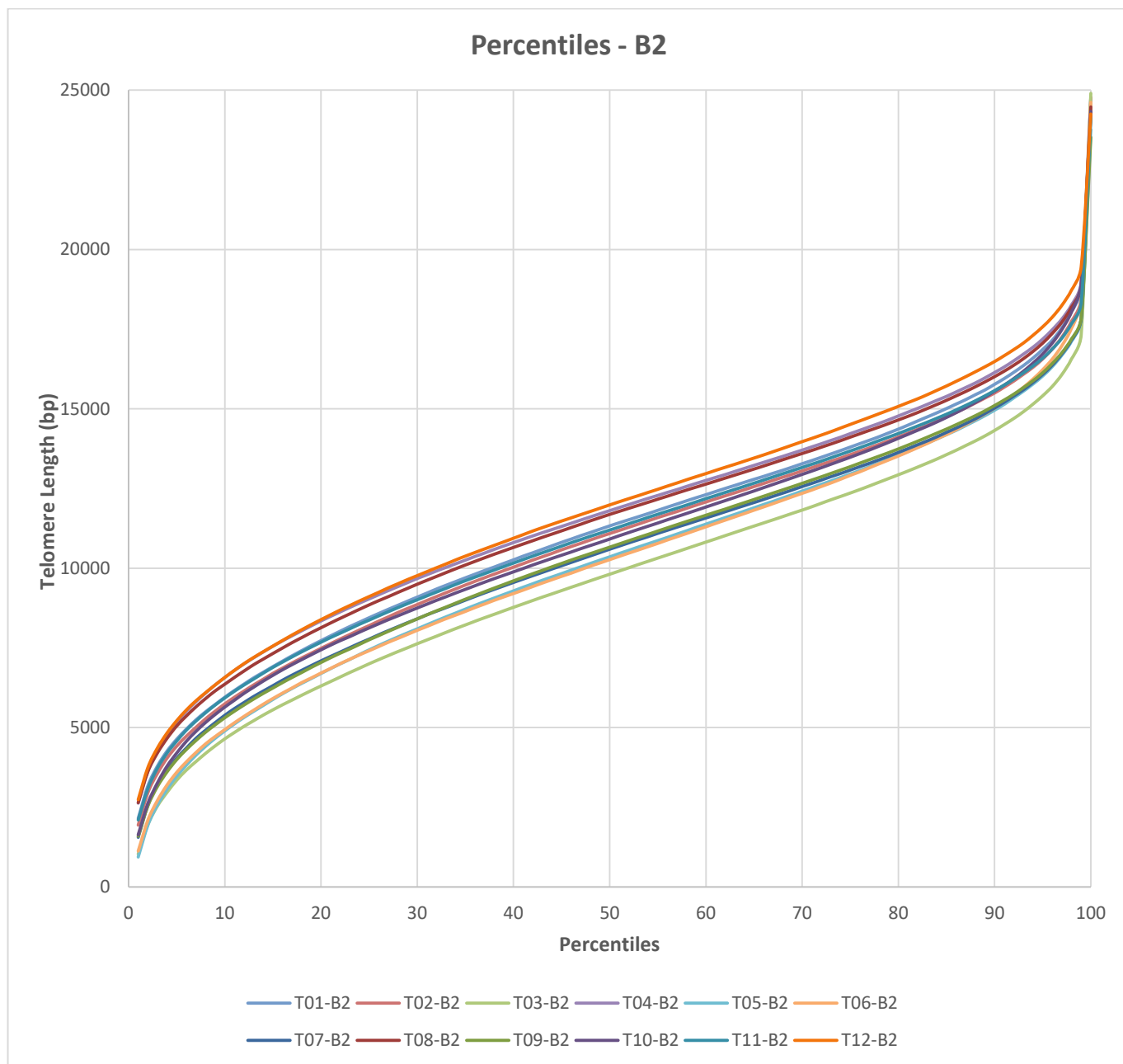
Extended Telomere Associated Variables (TAVs) analysis.

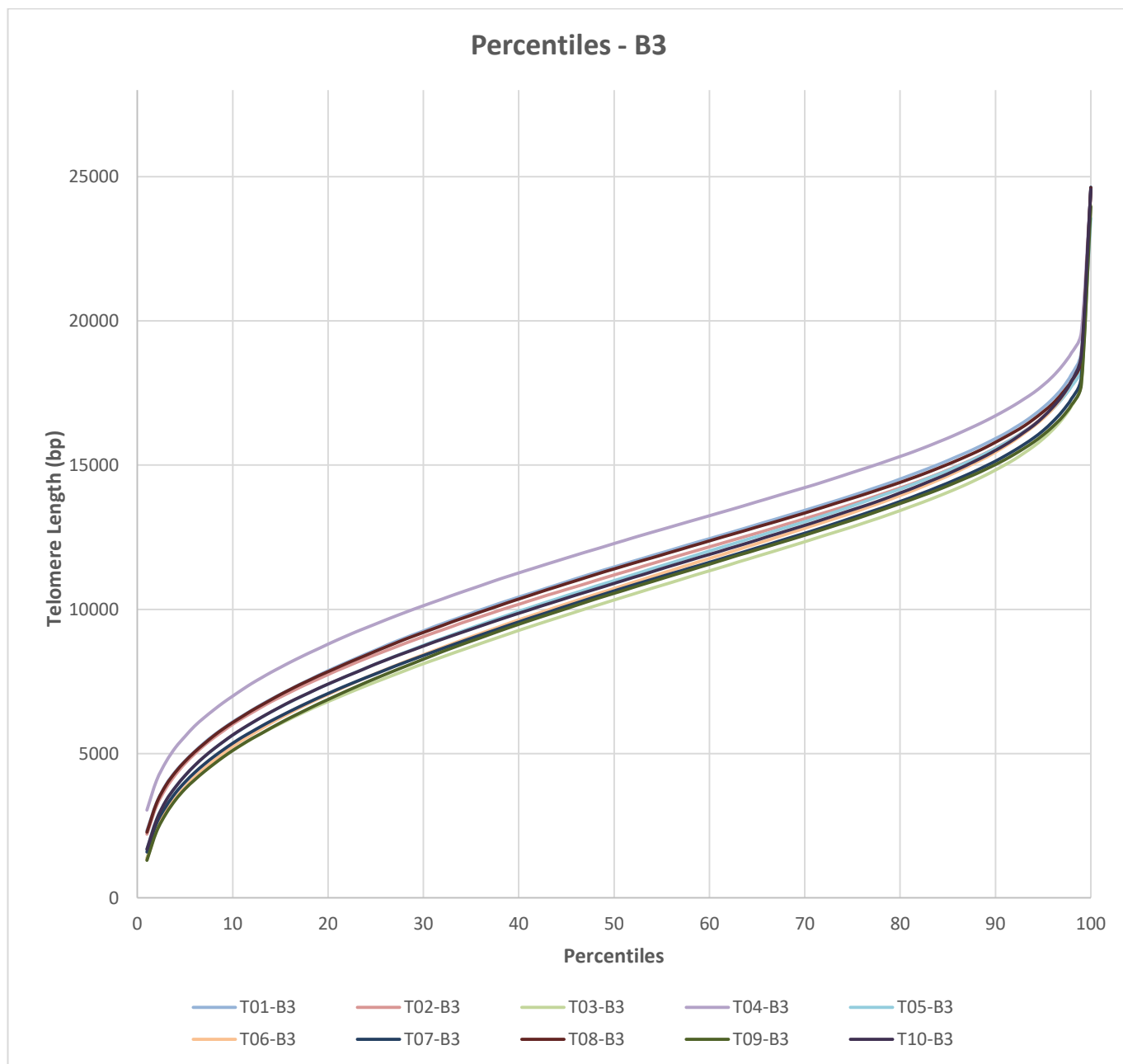
Telomere Length Percentiles

Percentile is the point in a distribution at which a given percentage of determined values or scores are found. Therefore, percentiles values indicate the telomere length in base pairs for each one of the percentiles in the telomere length distribution of each sample. For instance, in telomere length distributions as determined by HT-QFISH, a 20th percentile of 6,700 base pairs indicates that 20% of the telomeres in the sample have lengths below 6,700 base pairs.

Figure 3. Comparison of Percentile values.



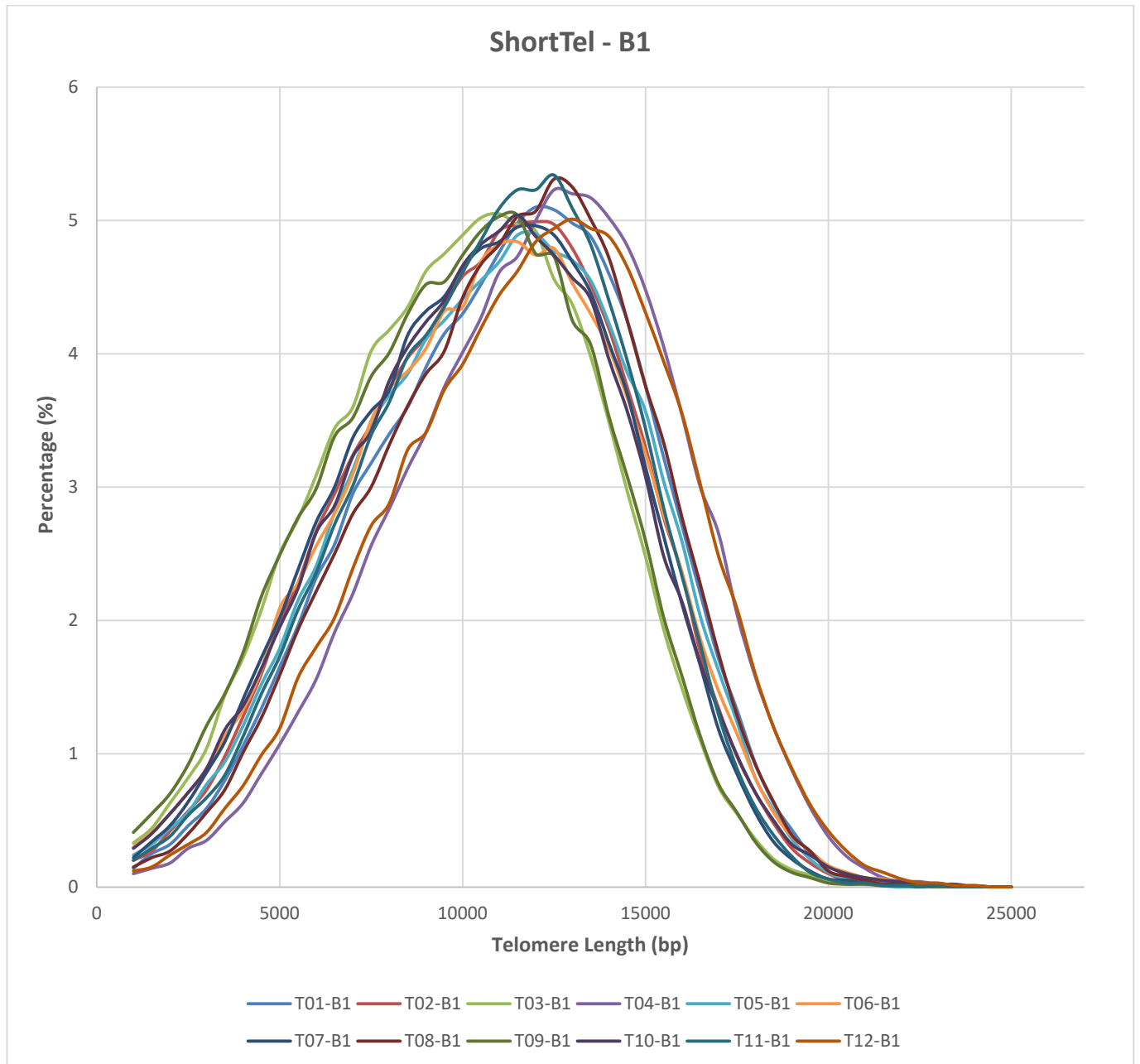


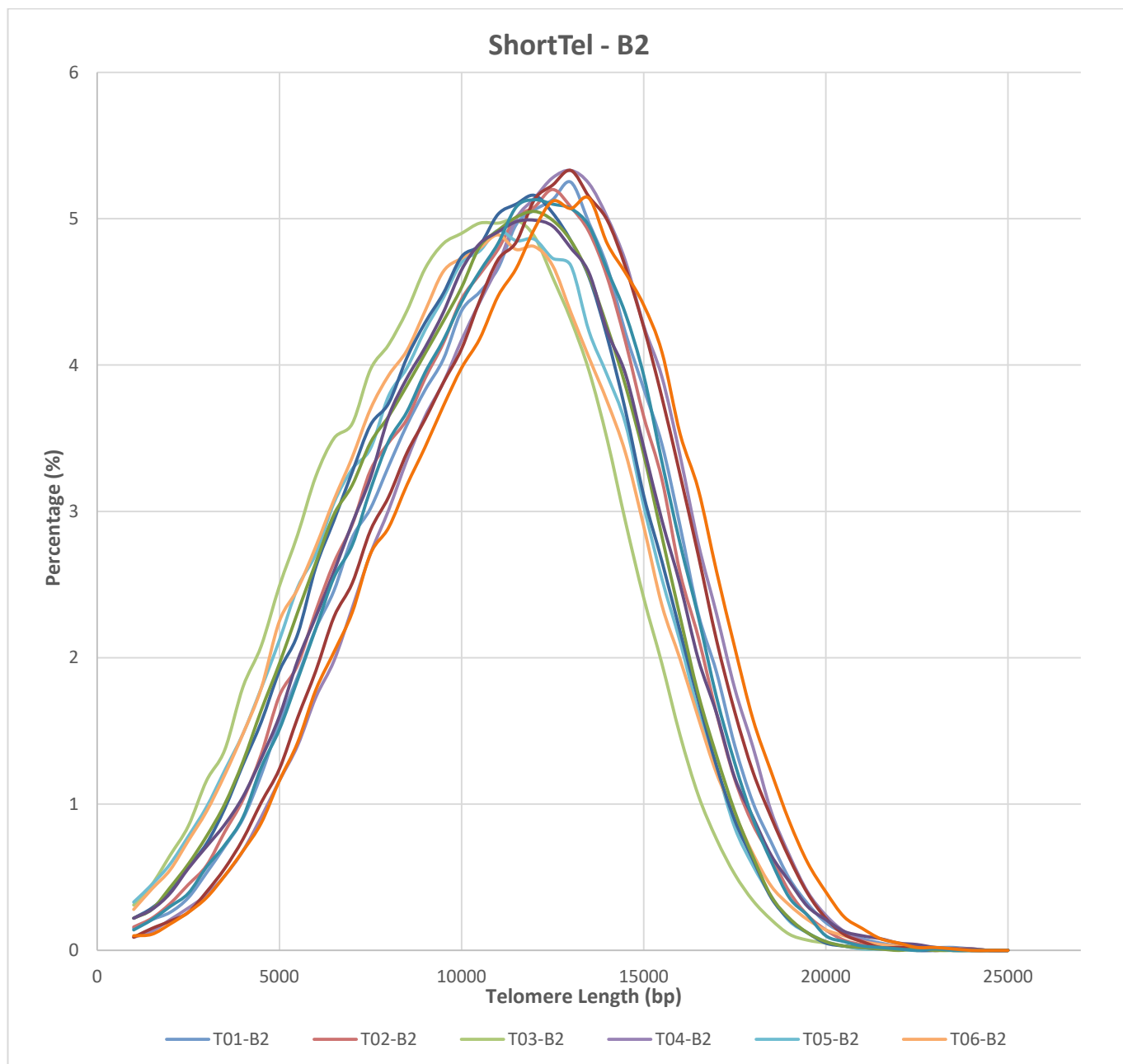


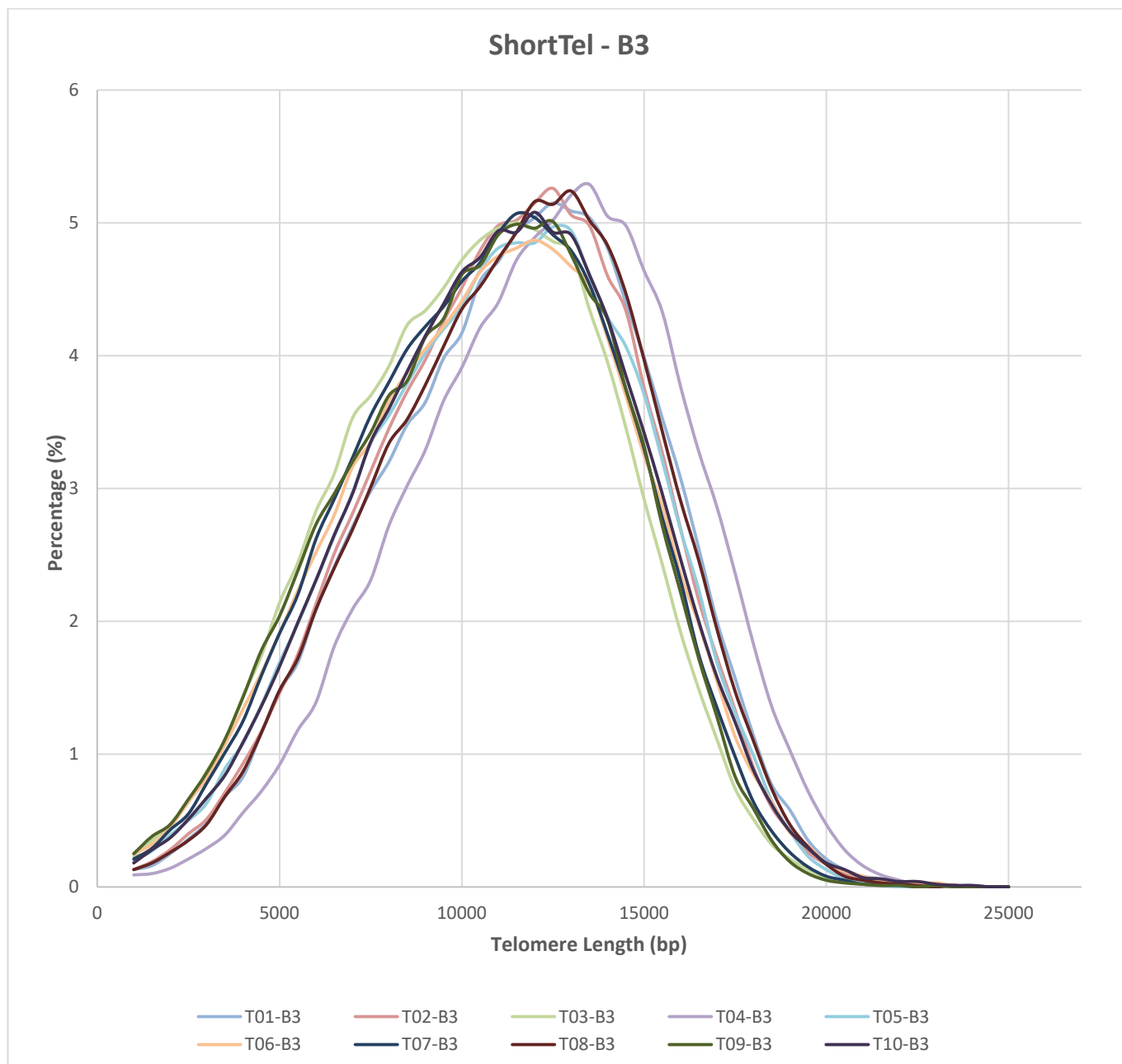
Percentages of telomeric length values - ShortTel

The “ShortTel” variable is measured in 500 base pairs intervals. These values indicate the percentage (%) of telomeres comprised between two specific telomere length values. For example, ShortTel 1000 indicates the percentage of telomeres that have a length between 500-1000 bp.

Figure 4. Comparison of ShortTel values.



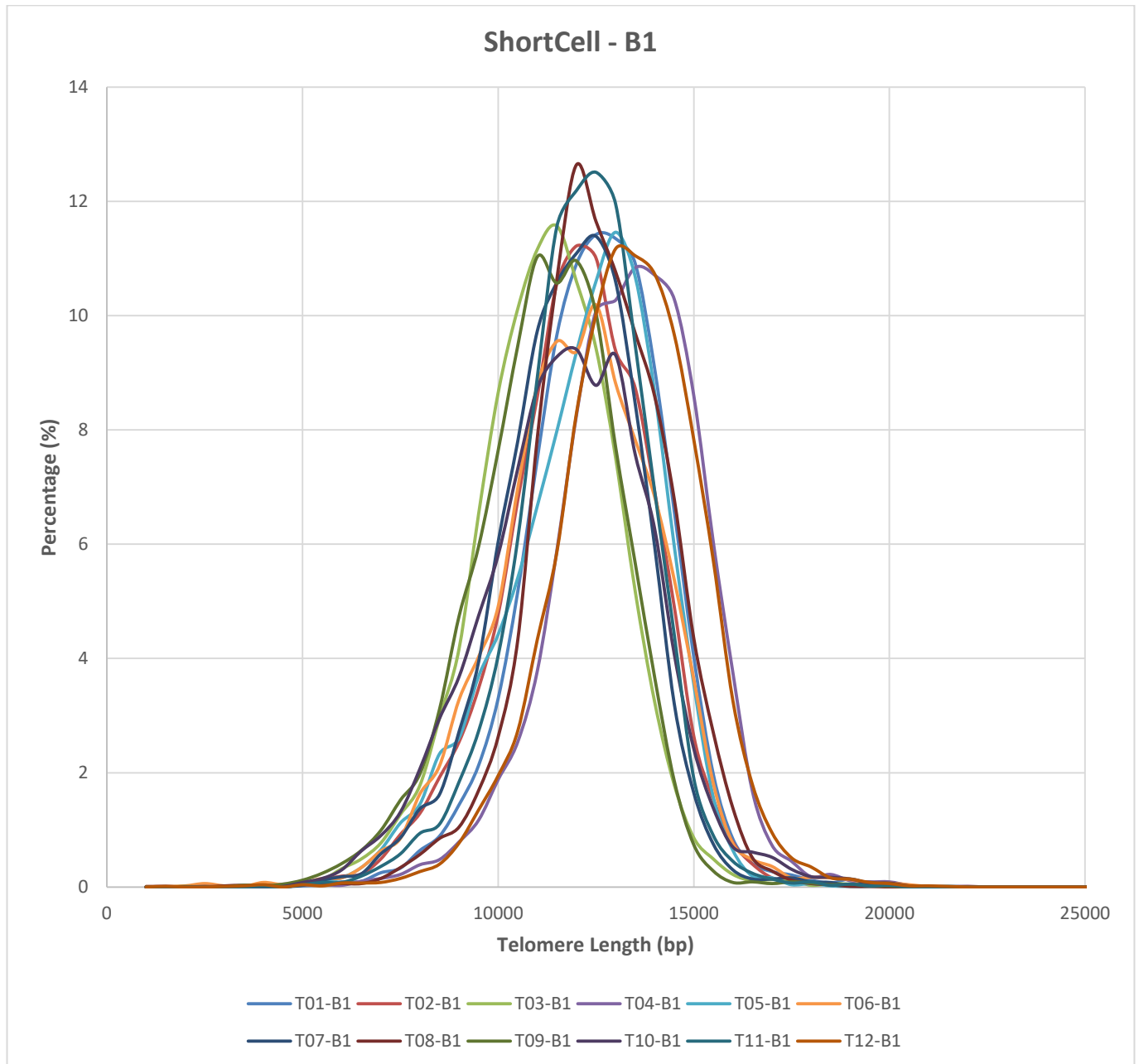


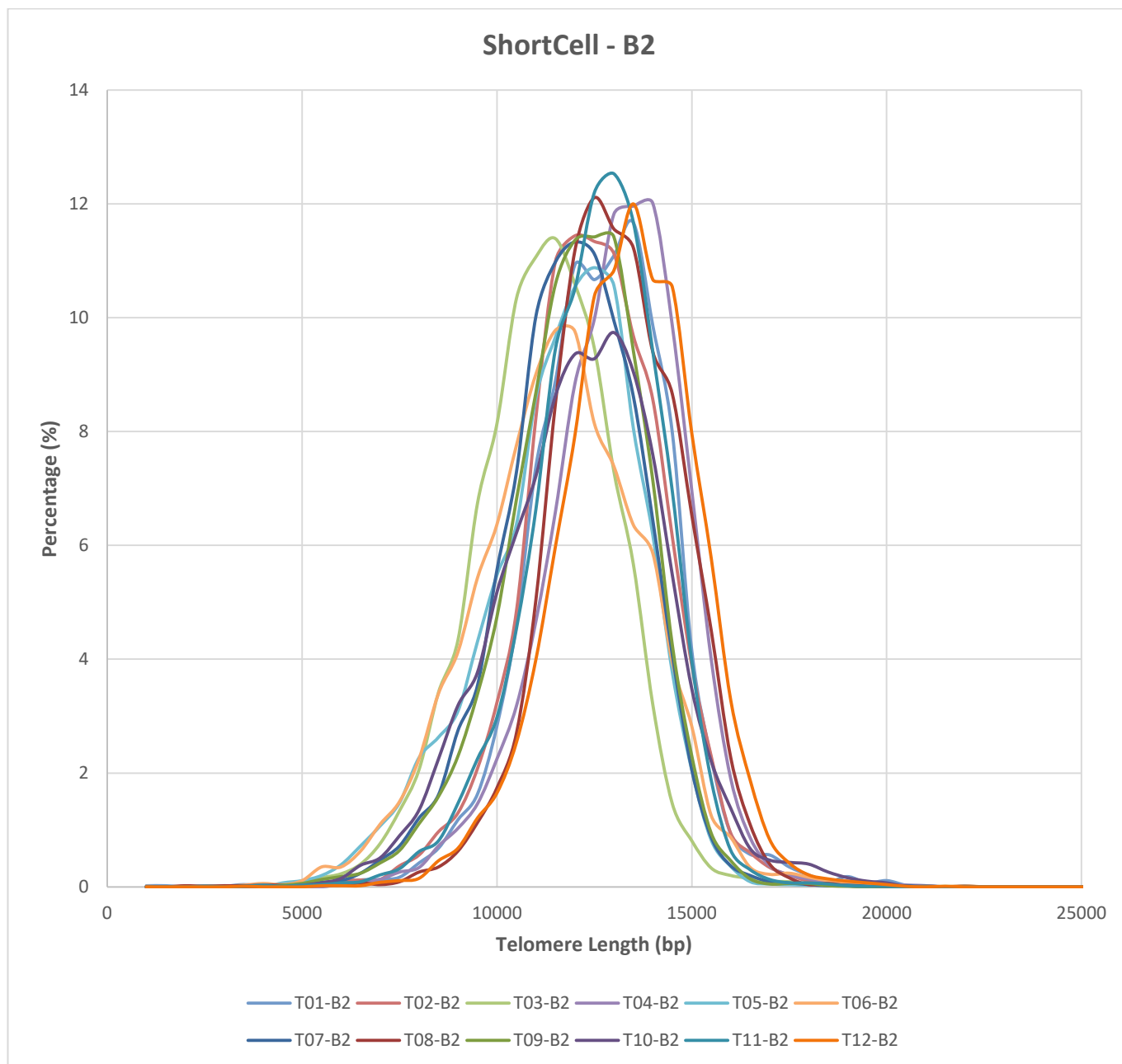


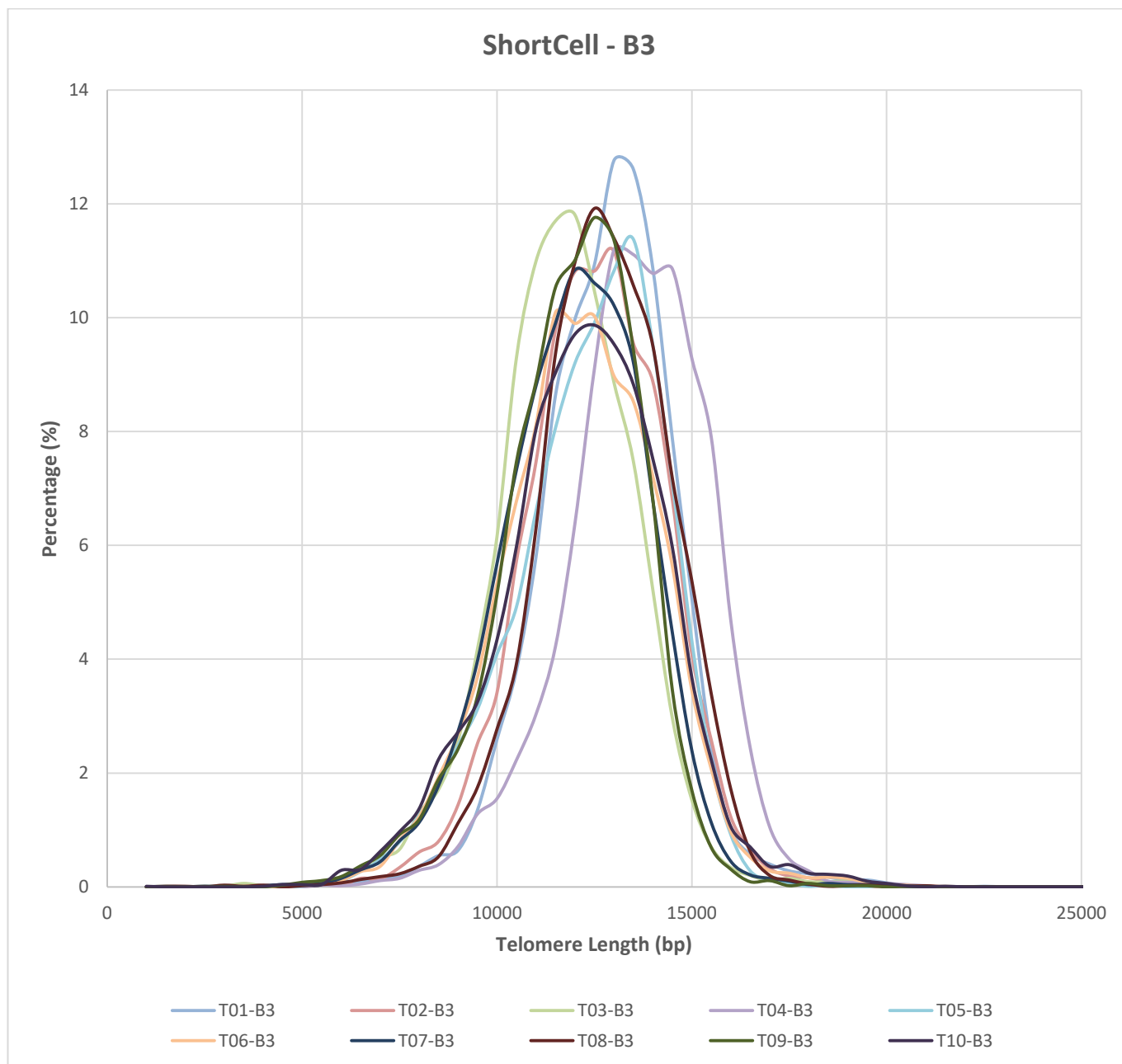
Percentages of cells with specific telomere values - ShortCell

The ShortCell variable is measured in 500 base pairs intervals. The ShortCell values indicate the percentage (%) of cells comprised between two specific telomere length values. For example, ShortCell 1000 is the percentage of cells that have an average telomere length between 500-1000 bp.

Figure 5. Comparison of ShortCell values.







All the raw data from the TAV analysis is included in the separate excel file provided with this report.

4. OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS

➤ Quality Control results

- Quantity of cells and their viability were within the acceptable range.
- The standard regression curve's coefficient of determination (R^2) for the test plate met our QC standards.
- More than 10000 telomeres were analyzed for all samples.

➤ TAT results

- Statistical differences were identified between various samples as it can be seen in Table 4. Sample T04-B3 shows the highest MTL, 20th Percentile and lowest percentage of short telomeres. Sample T09-B1 has the higher percentage of telomeres below 3 Kbp and the lowest telomere length in the 20th percentile, it has also one of the lowest MTLs. However, the shortest MTL value was detected in sample T03-B2 according to table 4.

Extensive analysis (TAVs)

Percentiles

- **B1:** Samples T04 – B1 and T12 – B1 have the best profiles, but sample T04 – B1 clearly has the best result since there are longer telomeres in the lower percentiles.
- **B2:** Sample T12 – B2 presents the best profile in comparison with the other samples, having longer telomeres in both the highest and the lowest percentiles.
- **B3:** Sample T04 – B3 has clearly the best profile in comparison with the other samples analyzed for B3.

ShortTel

- **B1:** Samples T04 – B1 and T12 – B1 present the highest percentages of long telomeres and the lowest percentages of short telomeres in the group. However, T04 – B1 has a lower quantity of telomeres with shorter lengths so we identify a better ShortTel profile for this sample.
- **B2:** T12 – B2 is the sample with the highest percentage of long telomeres and lowest percentage of short telomeres.
- **B3:** Sample T04 – B3 shows a different profile in comparison to the other samples from this group, having a much higher percentage of long telomeres and also the lowest percentage of short telomeres.

ShortCell

- **B1:** Samples T04 – B1 and T12 – B1 are the samples with the best cellular-telomeric profiles according to the ShortCell analysis. As such we find more cells with a higher average telomere length in T04 – B1 as well as a lower percentage of cells with shorter telomeres.

- **B2:** T12- B2 is the sample where we identified more cells with higher average telomere lengths and lower percentages of cells with shorter telomeres.
- **B3:** Again T04 – B3 is the sample with a higher percentage of cells with long telomeres and a lower percentage of cells with short telomeres. These results are aligned with the ones from the standard analysis, where sample T04 – B3 also showed the highest MTL and 20th percentile as well as the shorter percentage of telomeres < 3 kbp.

5. REFERENCES

1. Canela A1, Vera E, Klatt P, Blasco MA. (2007). High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci USA*. Mar 27;104(13):5300-5.
2. Kimura M1, Stone RC, Hunt SC, Skurnick J, Lu X, Cao X, Harley CB, Aviv A. (2010). Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nature Protocols* 5(9):1596-607.



LIFE LENGTH

Life Length is the leader in telomere diagnostics with offerings at the forefront of cutting edge technology.

For any clarifications or questions regarding the study results, please do not hesitate to contact us.

Visit us at: www.lifelength.com

CONTACT INFO

Life Length

C/Miguel Angel, 11 – 2nd floor
28010 – Madrid, Spain

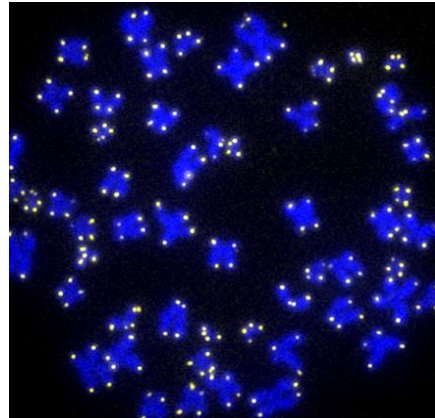
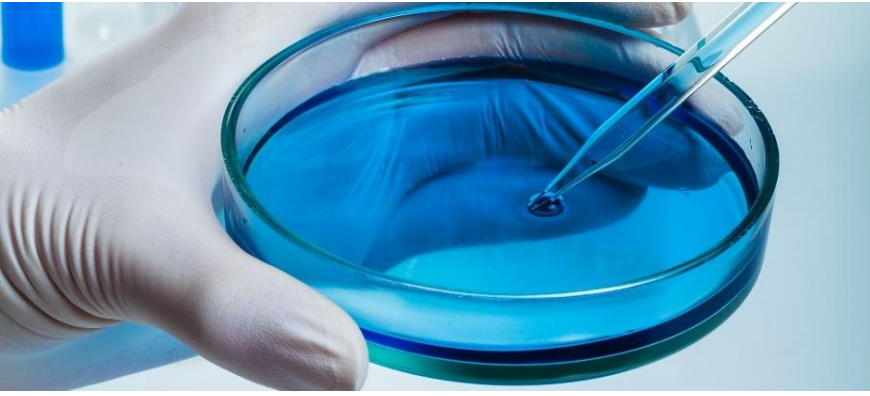
Tel: (+34) 91 737 1298

Fax: (+34) 91 310 1753

Email: info@lifelength.com



LIFE LENGTH



STUDY REPORT



LIFE LENGTH

17/12/2021

STUDY REPORT FOR BIOW

Telomere length analysis in cellular samples

Table of contents

- STUDY OBJECTIVE 2
- 1. TELOMERE LENGTH DETERMINATION BY TELOMERE ANALYSIS TECHNOLOGY® (TAT)..... 2**
- 1.1 TECHNIQUE OVERVIEW 2
- 1.2 TECHNOLOGY VALIDATION 3
- 1.3 RESULTS 3
 - Quality control parameters* 3
 - Cell count and viability results* 4
 - Telomere length results from TAT analysis* 4
- 1.4 DATA ANALYSIS..... 5
 - Extended Telomere Associated Variables (TAVs) analysis*..... 7
- 1.5 OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS..... 10
 - Quality Control results* 10
 - TAT y TAVs results and statistical analysis* 10
- 2. REFERENCES 10**

STUDY OBJECTIVE

Determination of telomere length variables in cellular samples

1. TELOMERE LENGTH DETERMINATION BY TELOMERE ANALYSIS TECHNOLOGY® (TAT)

1.1 TECHNIQUE OVERVIEW

For the measurement of the median telomere length of any cell line, Life Length (LL) uses a high-throughput (HT) Q-FISH technique. This method is based on a quantitative fluorescence *in-situ* hybridization method modified for cells in interphase. In brief, telomeres are hybridized with a fluorescent Peptide Nucleic Acid probe (PNA) that recognizes three telomere repeats (sequence: Alexa488-OO-CCCTAACCTAACCTAA, Panagene). The images of the nuclei and telomeres are captured by a high-content screen system (see below). The intensity of the fluorescent signal from the telomeric PNA probes that hybridize to a given telomere is proportional to the length of that telomere. The intensities of fluorescence are translated to base pairs through a standard regression curve which is generated using control cell lines with known telomere length.

Sample Preparation and HT Q-FISH: On processing day, the samples and control cell lines frozen in liquid nitrogen are thawed at 37°C and cell counts and cellular viability are determined. Aliquots with viability lower than 60% are considered below our QC standards and are not further analyzed. Cells are seeded in clear bottom black-walled 384-well plates at the density of 15,000 cells per well with 5 replicates of each sample and 8 replicates of each control cell line. Cells are fixed with methanol/acetic acid (3/1, vol/vol). Once these cells have fixed onto the plate, they are treated with pepsin to digest the cytoplasm and the nuclei are processed for *in situ* hybridization with the PNA probe. After several washing steps following standard DAPI incubation for DNA staining, the wells are filled up with mounting medium and the plate is stored overnight at 4°C.

HT Microscopy: Quantitative image acquisition and analysis is performed on a High Content Screening Opera Phenix System (Perkin Elmer), using the Columbus software, Version 2.9 (Perkin Elmer). Images are captured, using a 40 x 0.95 NA water immersion objective. UV and 488 nm excitation wavelengths are used to detect the DAPI and A488 signals respectively. With constant exposure settings, 15 independent images are captured at different positions for each well. Next, the nuclei images are used to define the region of interest for each cell, measuring telomere fluorescence intensity of the A488 image in all of them. The results of intensity for each foci are exported to the Columbus 2.4 software (Perkin Elmer). Telomere length distribution and median telomere length are calculated with Life Length's proprietary algorithms. Statistical analysis of the data was performed using T-Student test.

1.2 TECHNOLOGY VALIDATION

The TAT technology has been validated for the following parameters:

Accuracy: The establishment of a correspondence between TAT fluorescence intensity values and telomere length measurements is achieved by performing TRF (Terminal Restriction Fragmentation) in six human lymphocyte cell lines (Calibration / Method Comparison).

The same set of samples is analyzed both by TAT and by the TRF reference method (Definition of TAT Systemic Error).

VALIDATION DATA shows a correlation of 0.99.

Precision: Serial analysis of the median telomere length values is performed on a human lymphocyte sample in different runs, days and plate positions in order to define TAT Random Error parameters (Standard Deviation, Variance).

Limit of Detection and Specificity: Definition of image analysis algorithms and protocol settings exist that define the lowest significant spot intensities and avoid interference by nonspecific fluorescence signals.

Median Reportable Range: Analysis of median telomere length of 6 cell lines is performed that covers our reportable range and defines its lower and upper limits.

VALIDATION DATA fix lower level at 4,700 base pairs and upper level at 14,400 base pairs.

Reference Range: Analysis of median telomere length have been conducted in hundreds of human samples in order to define the TAT Reference Range and its percentiles (5th, 10th, 25th, 50th, 75th and 95th) for different ages.

VALIDATION DATA established population curves - normal population data base from 18 to 85 years, to extrapolate patients' data and generate reports.

1.3 RESULTS

Quality control parameters

Previous to plating and before conducting the TAT protocol, the samples were assessed for:

- **Cell count:** An automated cell counter is used to determine the total number of cells in the vials.
- **Cell viability** by Tripan-Blue exclusion method.
- **Regression Curve:** Internal controls are included and a regression analysis is performed for each run/plate. The plates are repeated if their regression curves have an R^2 below 0.92.
- **Imaging analysis filters:** Data are filter-Homogenized after imaging analysis discarding spurious data, outliers and no-representative images of the sample.
- **Replicates:** After seeding and once TAT is completed:
 - Samples should have a CV below 10%.
 - Samples with less than 3 valid replicates at the end of the analysis are discarded.
 - Spot number analyzed per sample should be higher than 10,000.

Cell count and viability results

Table 1: Concentration and viability of samples after thawing.

Life Length ID	Client ID	Cell Conc. (cells/mL)	Viability (%)
LLCR034037	T01-100	2100000	93
LLCR034038	T02-100	2500000	80
LLCR034039	T03-100	2100000	81
LLCR034040	T04-100	2500000	79
LLCR034041	T05-100	2100000	87
LLCR034042	T06-100	3900000	87
LLCR034043	T07-100	2300000	95
LLCR034044	T08-100	3100000	91
LLCR034045	T09-100	2700000	90
LLCR034046	T10-100	3000000	79
LLCR034047	T11-100	2800000	92
LLCR034048	T12-100	3700000	91

Telomere length results from TAT analysis

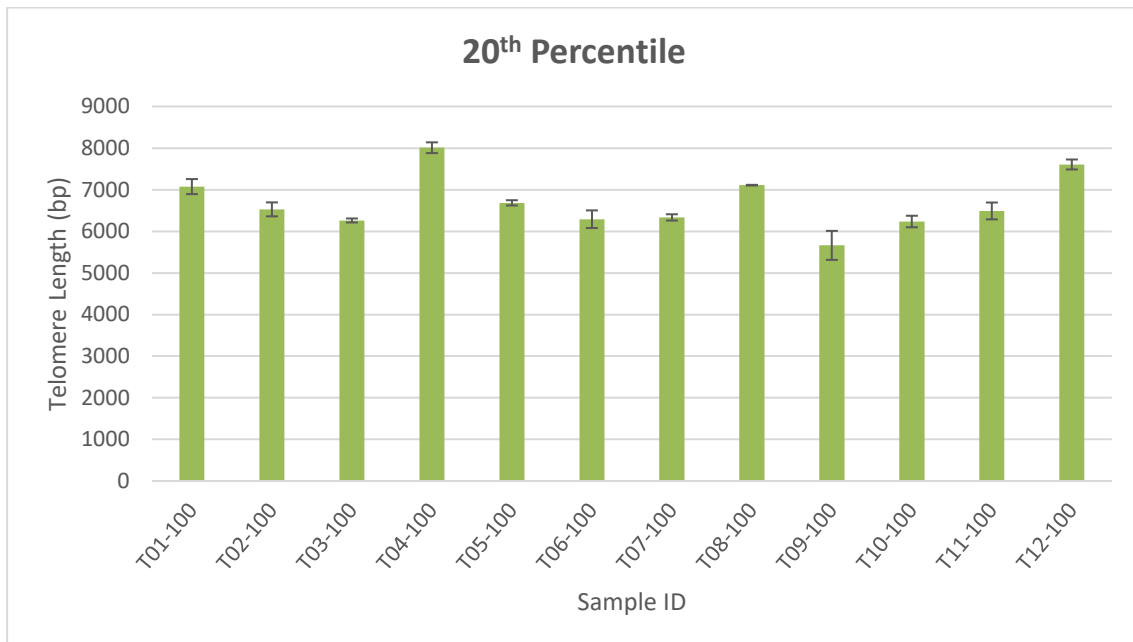
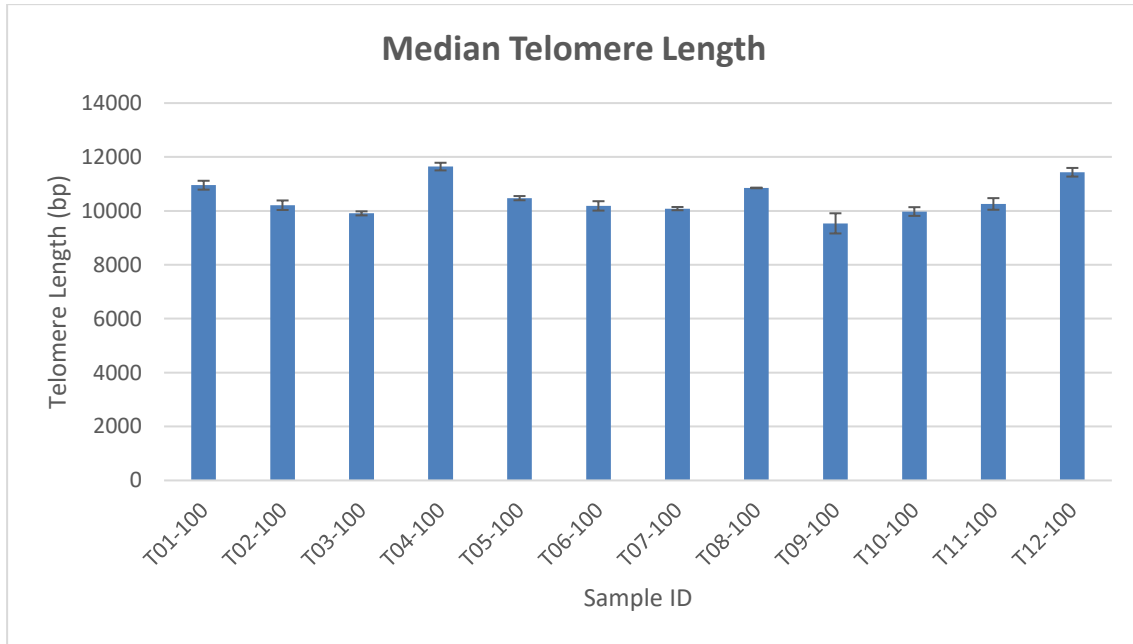
The following table shows the median telomere length (MTL) and 20th percentile telomere length (both in base pairs - bp) for each sample as well as the percentage of short telomeres. The latter is defined as the percentage of the telomeres with a length below 3 Kbp (<3 Kbp). All measurements were performed in quintuplicates.

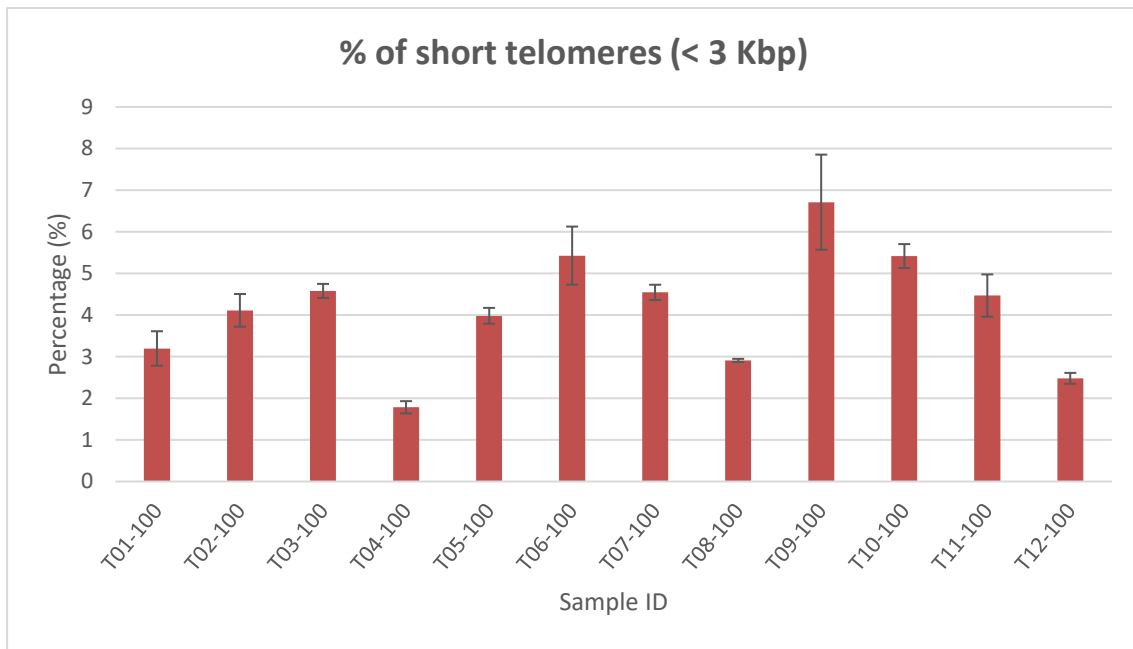
Table 2. Telomere length results from TAT analysis.

Life Length ID	Client ID	Median Telomere Length (bp)	20 th Percentile Length (bp)	Telomeres <3 Kbp (%)	CV (%)
LLCR034037	T01-100	10952	7075	3.2	1.5
LLCR034038	T02-100	10210	6528	4.1	1.7
LLCR034039	T03-100	9908	6261	4.6	0.8
LLCR034040	T04-100	11643	8009	1.8	1.2
LLCR034041	T05-100	10472	6684	3.9	0.7
LLCR034042	T06-100	10185	6291	5.4	1.7
LLCR034043	T07-100	10084	6334	4.5	0.6
LLCR034044	T08-100	10852	7109	2.9	0.1
LLCR034045	T09-100	9536	5662	6.7	3.9
LLCR034046	T10-100	9976	6236	5.4	1.6
LLCR034047	T11-100	10257	6489	4.5	2.1
LLCR034048	T12-100	11433	7606	2.5	1.4

1.4 DATA ANALYSIS

Figure 1 - 3. Bar charts of TAT results (Median Telomere Length, 20th Percentile Telomere Length and % Short Telomeres) for all samples.





A statistical analysis of the results is included in the separate excel file provided with this report.

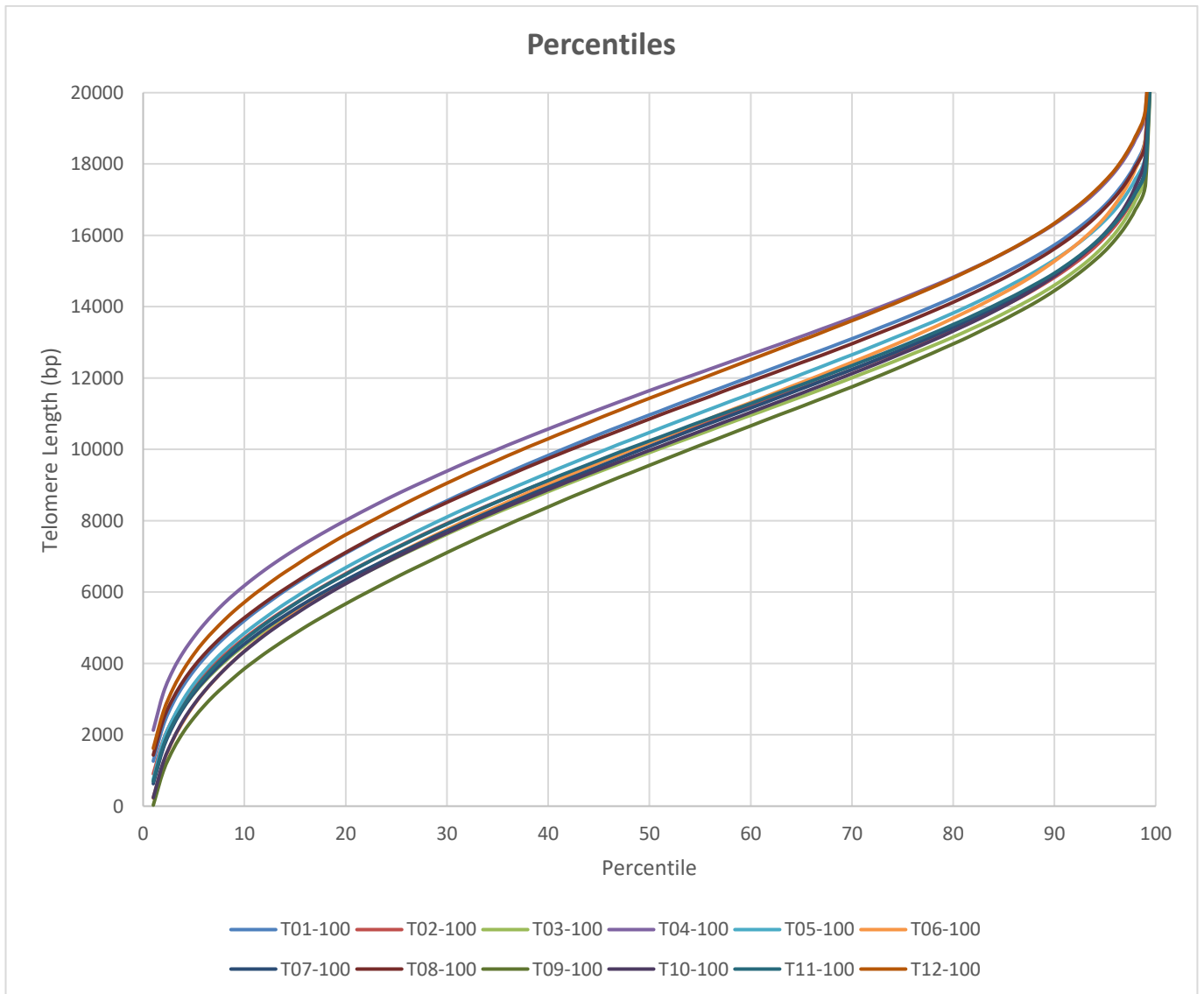
Extended Telomere Associated Variables (TAVs) analysis.

Telomere Length Percentiles

Percentile is the point in a distribution at which a given percentage of determined values or scores is found. Therefore, percentiles values indicate the telomere length in base pairs for each one of the percentiles in the telomere length distribution of each sample.

For instance, in telomere length distributions as determined by HT-QFISH, a 20th percentile of 6,700 base pairs indicates that 20% of the telomeres in the sample have lengths below 6,700 base pairs.

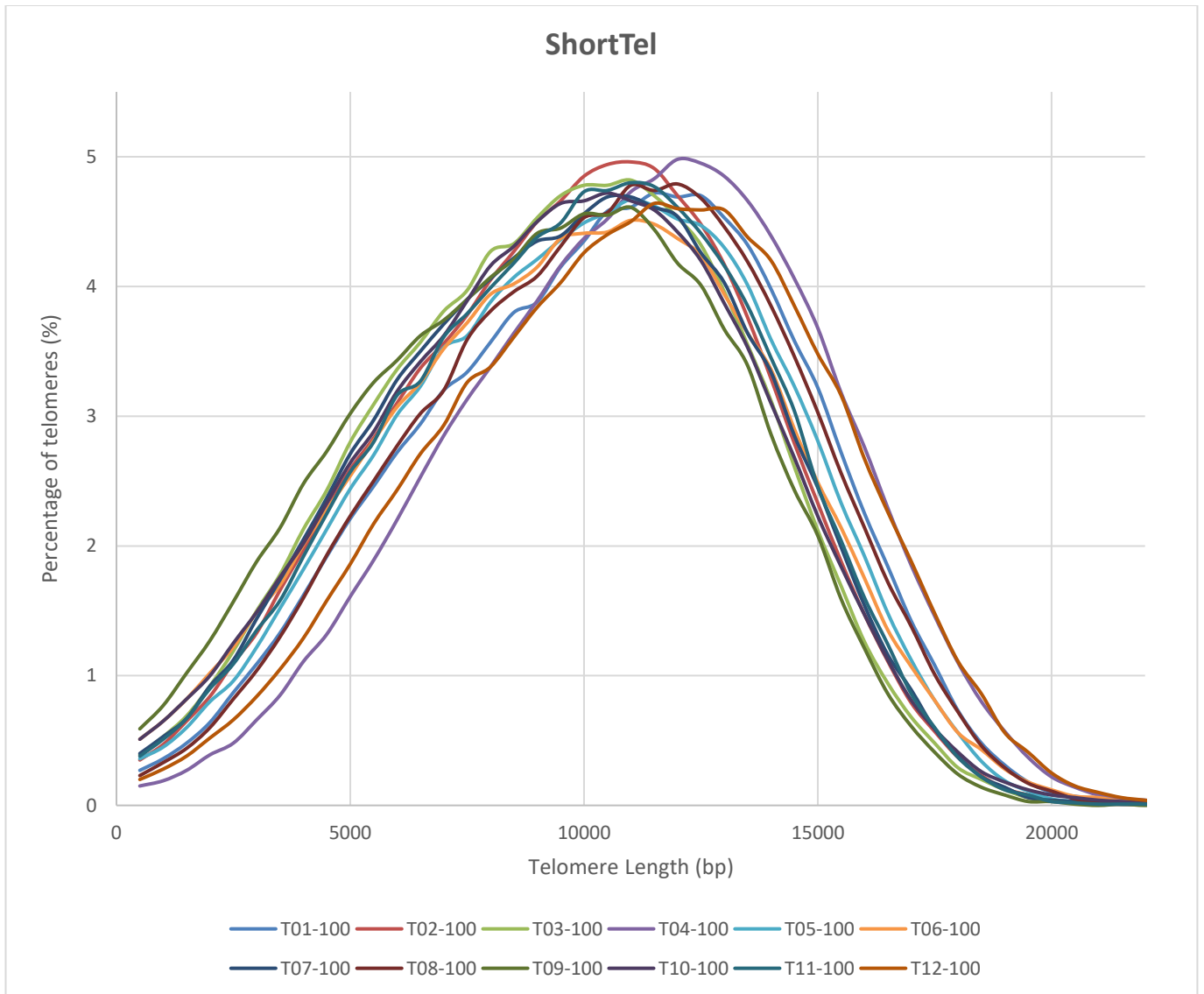
Figure 4. Comparison of Percentile curves for samples.



Percentages of telomeric length values - ShortTel

The “ShortTel” variable is measured in 500 base pairs intervals. These values indicate the percentage (%) of telomeres comprised between two specific telomere length values. For example, ShortTel 1000 indicates the percentage of telomeres that have a length between 500-1000 bp.

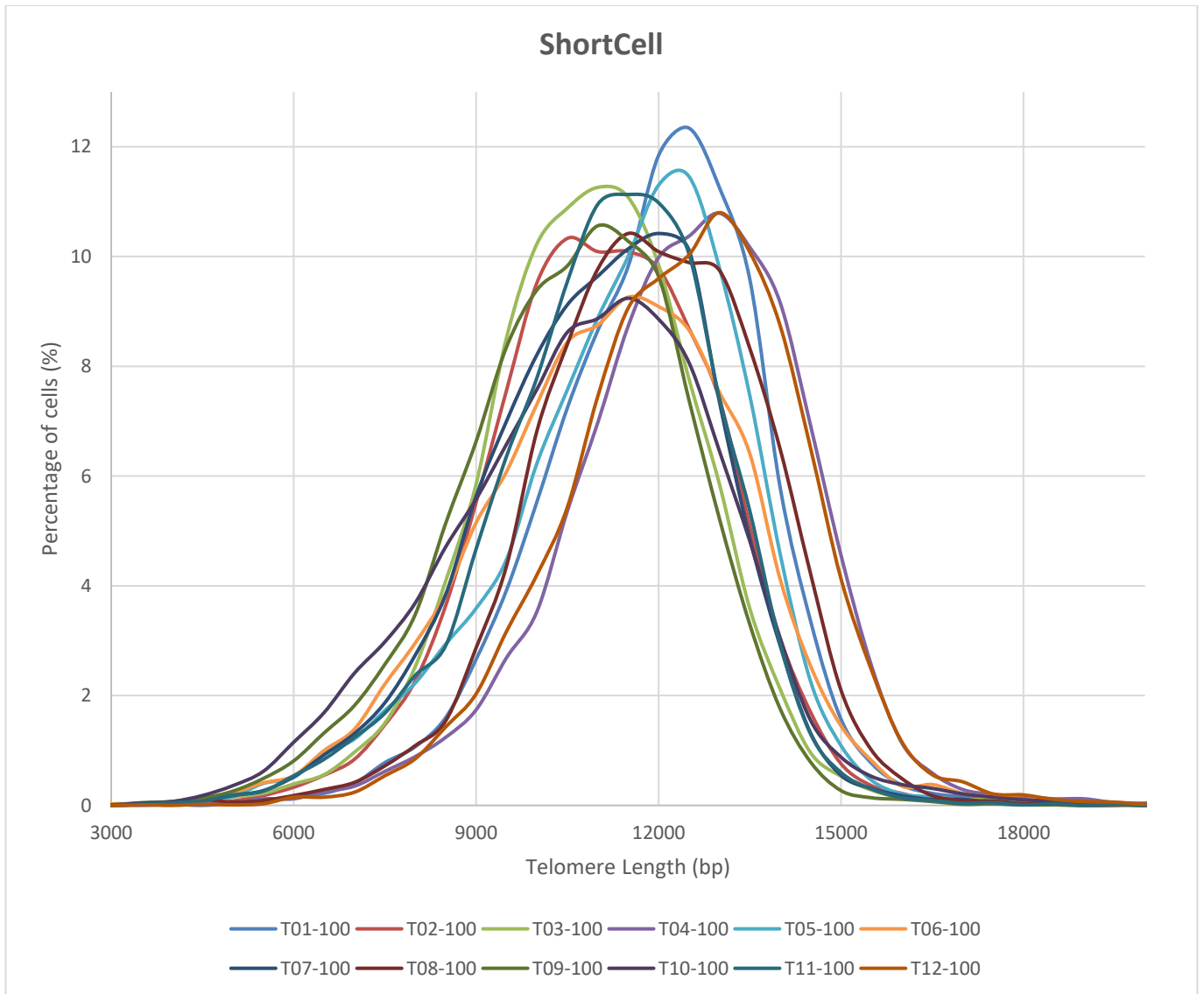
Figure 5. Comparison of ShortTel values for samples.



Percentages of cells with specific telomere values - ShortCell

The ShortCell variable is measured in 500 base pairs intervals. The ShortCell values indicate the percentage (%) of cells comprised between two specific telomere length values. For example, ShortCell 1000 is the percentage of cells that have an average telomere length between 500-1000 bp.

Figure 6. Comparison of ShortCell values for samples.



1.5 OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS

Quality Control results

- The standard regression curve's coefficient of determination R^2 for the plates analyzed met our quality control standards ($R^2 > 0.92$).
- More than 10000 telomeres were analyzed for all samples.

TAT y TAVs results and statistical analysis

- Various biological differences were detected between the samples not only in general variables as (MTL, 20th percentile and short telomere <3Kpb) (Fig 3) but the other all telomere variables determined (Fig 4, 5 and 6).
- Samples T04-100 and T12-100 present the highest telomere lengths in all the percentiles, being sample T04-100 the one that has fewer short telomeres since their length is longer in the lowest percentiles. This is also mirrored in the ShortTel category, where the lowest percentages of short telomeres were found.
- Samples T04-100 and T12-100 present the highest percentages of cells with long telomeres and the lowest percentages of cells showing short telomeres.

2. REFERENCES

- Canela A1, Vera E, Klatt P, Blasco MA. (2007). High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. Proc Natl Acad. Sci USA. Mar 27; 104 (13):5300-5.



LIFE LENGTH

Life Length is the leader in telomere diagnostics with offerings at the forefront of cutting edge technology.

For any clarifications or questions regarding the study results, please do not hesitate to contact us.

Visit us at: www.lifelength.com

CONTACT INFO

Life Length

C/Miguel Angel, 11 – 2nd floor
28010 – Madrid, Spain

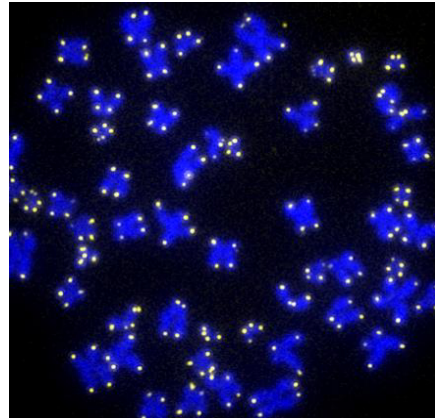
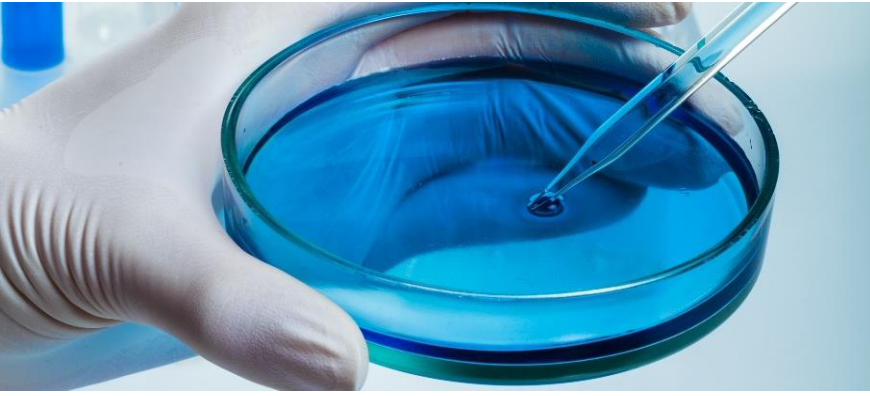
Tel: (+34) 91 737 1298

Fax: (+34) 91 310 1753

Email: info@lifelength.com



LIFE LENGTH



STUDY REPORT

bio:w



LIFE LENGTH

29TH SEPTEMBER 2021
STUDY REPORT FOR BIOW

Telomerase activity analysis (Q TRAP) for Biow

Table of Contents

STUDY OBJECTIVE	1
1. TELOMERASE ACTIVITY DETERMINATION BY TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION	
PROTOCOL (Q-TRAP)	1
1.1 TECHNIQUE OVERVIEW	1
1.2 RESULTS	2
<i>Quality control parameters</i>	2
<i>QC for protein concentration</i>	2
<i>Telomerase Activity results</i>	3
<i>Data analysis</i>	5
1.3 OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS.....	5
2. REFERENCES	5

STUDY OBJECTIVE

Determination of telomerase activity in cellular samples

1. TELOMERASE ACTIVITY DETERMINATION BY TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL (Q-TRAP)

1.1 TECHNIQUE OVERVIEW

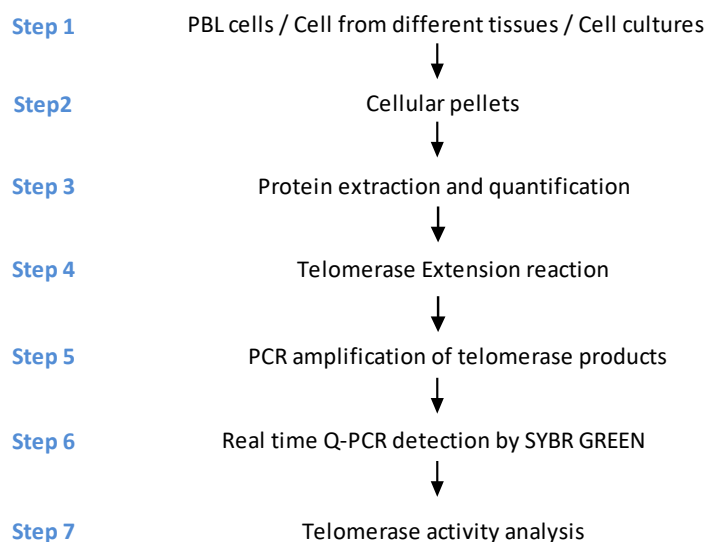
Life Length's (LL) Q-TRAP can measure relative telomerase activity by the Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP), modified for real-time, quantitative PCR analysis (Q-TRAP). This method has the advantages of exquisite sensitivity, rapidity, and a high-throughput format in respect to the regular TRAP assay. We assess telomerase enzyme activity in whole cell lysates from cell cultures. These samples are appropriately purified, pelleted and stored at -80 °C for optimal preservation.

The general mechanism of the Q-TRAP technique involves cellular pellets being lysed for protein extraction which is then subsequently quantified and stored under specific conditions to avoid protein degradation. Telomerase protein extracts are then incubated with a specific oligonucleotide substrate to allow the enzymatic addition of telomeric DNA repeats by endogenous telomerase.

Following the enzymatic reaction, telomerase extension products are then amplified and quantified by real-time qPCR. In real time PCR, a positive reaction is detected by accumulation of a fluorescent signal. The Ct (cycle threshold) is defined as the number of cycles required for fluorescence to cross the threshold (i.e.: exceeds background levels). The telomerase-positive standard dilution series is plotted against the telomere protein concentration ($r^2 > 0.9$) as a standard curve of Ct values.

To ensure that the data are both reproducible and quantitative, we routinely perform the assay in triplicate. The mean and standard deviation (SD) from each triplicate is calculated which include both positive (lymphoid cell line) and negative controls (inactivated by heat) are included.

Data are reported as **RTA (Relative Telomerase Activity)** and the general workflow scheme can be seen below.



1.2 RESULTS

Quality control parameters

Previous to plating and before conducting Q-TRAP protocol samples were assessed for:

- Protein concentration: Protein quantification is performed in each sample using Pierce TM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific # 23225). A minimum of 0.3 µg/µL of protein concentration is required to proceed with the analysis of the samples to guarantee consistent results.
- Regression Curve: Internal controls are included and a regression analysis is performed for each run/plate. Those plates in which regression curves have an R² below 0.9 are repeated.
- Replicates: Samples with less than 2 valid replicates are discarded.
- Cycle amplification: Signals obtained after cycle #35 are considered unspecific amplification.

QC for protein concentration

To calculate protein concentration a Pierce TM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific # 23225) was used. Each treatment was tested in triplicate:

Table 1. Protein concentration results for samples analyzed by Q-TRAP

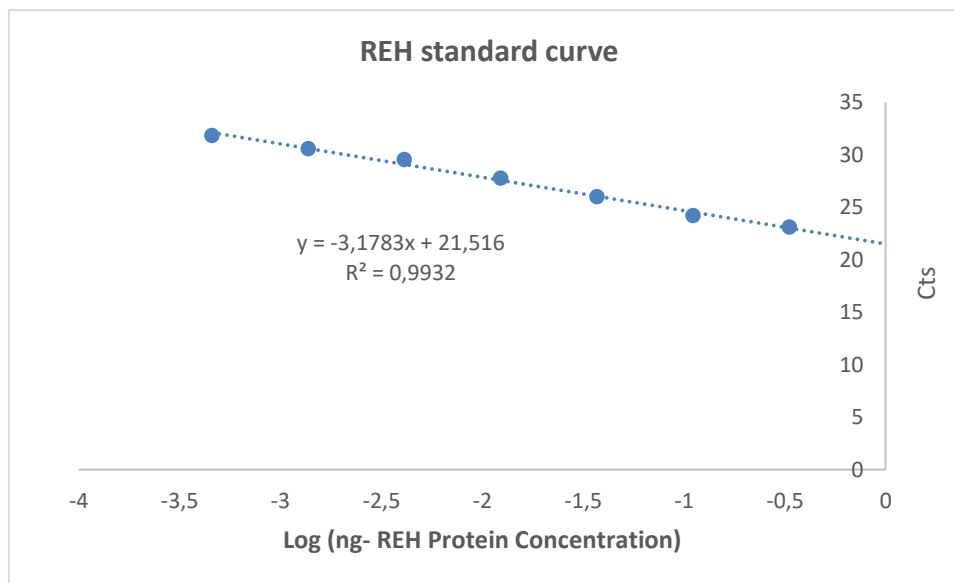
Life Length ID	Client ID	Protein Conc. (µg/µL)
LLCR034001	T01-B1	1.21
LLCR034002	T02-B1	1.12
LLCR034003	T03-B1	1.01
LLCR034004	T04-B1	1.44
LLCR034005	T05-B1	0.85
LLCR034006	T06-B1	0.90
LLCR034007	T07-B1	1.43
LLCR034008	T08-B1	1.35
LLCR034009	T09-B1	0.89
LLCR034010	T10-B1	1.25
LLCR034011	T11-B1	1.69
LLCR034012	T12-B1	1.64
LLCR034013	T01-B2	1.85
LLCR034014	T02-B2	1.62
LLCR034015	T03-B2	1.86
LLCR034016	T04-B2	2.34
LLCR034017	T05-B2	1.60
LLCR034018	T06-B2	1.90
LLCR034019	T07-B2	1.69
LLCR034020	T08-B2	2.07
LLCR034021	T09-B2	1.51
LLCR034022	T10-B2	1.53
LLCR034023	T11-B2	1.63

LLCR034024	T12-B2	2.24
LLCR034025	T01-B3	2.14
LLCR034026	T02-B3	2.03
LLCR034027	T03-B3	1.95
LLCR034028	T04-B3	1.95
LLCR034029	T05-B3	1.37
LLCR034030	T06-B3	1.75
LLCR034031	T07-B3	1.78
LLCR034032	T08-B3	1.89
LLCR034033	T09-B3	1.74
LLCR034034	T10-B3	1.84

Telomerase Activity results

Standard curve results: generated by graphing Threshold cycles (Ct values) of REH cell line standard against log of 1000, 333, 111, 37, 12.3, 4.11, 1.37 and 45 ng of protein (whole cell extract).

Figure 1. Standard curve of Ct values of protein from REH cells against log of protein (ng). The cycle number at the threshold (Ct value) for each sample is interpolated in the curve, in order to calculate the relative telomerase activity (RTA).



Measurements were performed in triplicates to calculate coefficients of variation and mean amplification signals.

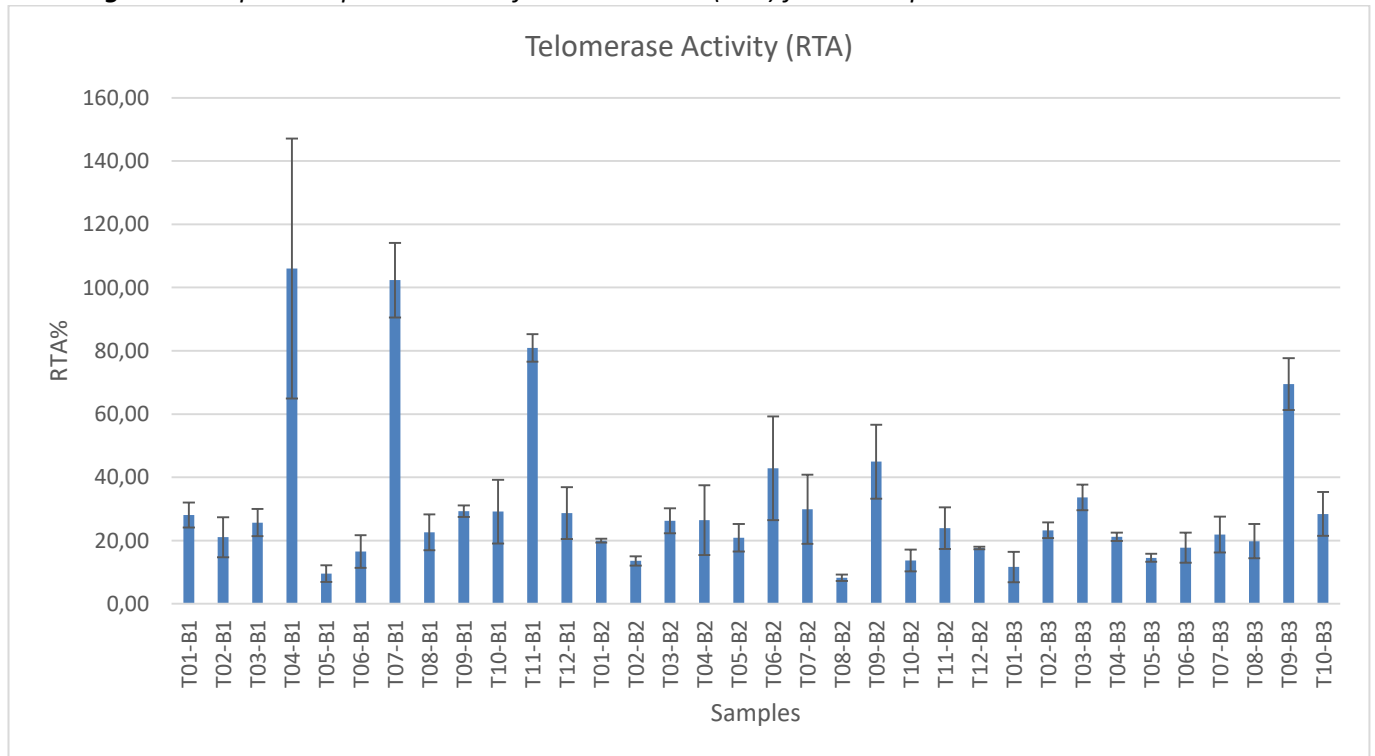
The table below summarize the individual data, mean and SD after normalization against REH control reported as Relative Telomerase Activity (RTA) for each sample.

Table 2. RTA values for all samples analyzed

Life Length ID	Client ID	RTA (%)	SD (%)
LLCR034001	T01-B1	28.08	3.98
LLCR034002	T02-B1	21.04	6.29
LLCR034003	T03-B1	25.68	4.29
LLCR034004	T04-B1	106.04	41.09
LLCR034005	T05-B1	9.54	2.64
LLCR034006	T06-B1	16.53	5.15
LLCR034007	T07-B1	102.33	11.78
LLCR034008	T08-B1	22.59	5.69
LLCR034009	T09-B1	29.33	1.83
LLCR034010	T10-B1	29.14	10.11
LLCR034011	T11-B1	80.93	4.35
LLCR034012	T12-B1	28.67	8.20
LLCR034013	T01-B2	20.00	0.59
LLCR034014	T02-B2	13.56	1.44
LLCR034015	T03-B2	26.28	3.96
LLCR034016	T04-B2	26.44	11.00
LLCR034017	T05-B2	20.88	4.38
LLCR034018	T06-B2	42.85	16.42
LLCR034019	T07-B2	29.88	10.91
LLCR034020	T08-B2	8.25	1.04
LLCR034021	T09-B2	44.97	11.69
LLCR034022	T10-B2	13.73	3.43
LLCR034023	T11-B2	23.89	6.58
LLCR034024	T12-B2	17.63	0.40
LLCR034025	T01-B3	11.64	4.81
LLCR034026	T02-B3	23.25	2.44
LLCR034027	T03-B3	33.64	4.07
LLCR034028	T04-B3	21.19	1.33
LLCR034029	T05-B3	14.55	1.25
LLCR034030	T06-B3	17.73	4.77
LLCR034031	T07-B3	21.88	5.65
LLCR034032	T08-B3	19.81	5.44
LLCR034033	T09-B3	69.51	8.20
LLCR034034	T10-B3	28.39	6.94

Data analysis

Figure 2. Graphical representation of Q-TRAP results (RTA) for all samples.



A statistical analysis of the results is included in the separate excel file provided with this report.

1.3 OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS

- Protein extraction yields from samples has rendered suitable amount of protein (> 0.3 µg/µL) to perform the Q-TRAP assay.
- The regression curve's coefficient of determination (REH Cells) was higher than 0.9 ($R^2 = 0.99$).
- From previous observations, telomerase RTA levels below 20% are considered basal. Therefore, we observe that many samples tested have the enzyme telomerase active, being especially high in samples T04-B1 and T07-B1.

2. REFERENCES

- Lorenzo Galluzzi et al. (eds), Cell Senescence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol 965, DOI 10.1007/978-1-62703-239-1_14, © Springer Science+Business Media, LLC 2013.
- Herbert B., Hochreiter AE, Wright WE, Shay JW (2006). Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol. Nature Protocols, 1(3):1583-90.



LIFE LENGTH

Life Length is the leader in telomere diagnostics with offerings at the forefront of cutting edge technology.

For any clarifications or questions regarding the study results, please do not hesitate to contact us.

Visit us at: www.lifelength.com

CONTACT INFO

Life Length

C/Miguel Angel, 11 – 2nd floor
28010 – Madrid, Spain

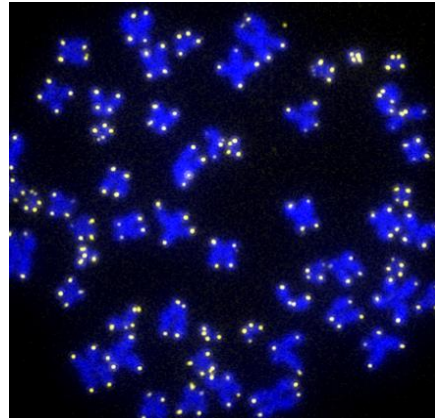
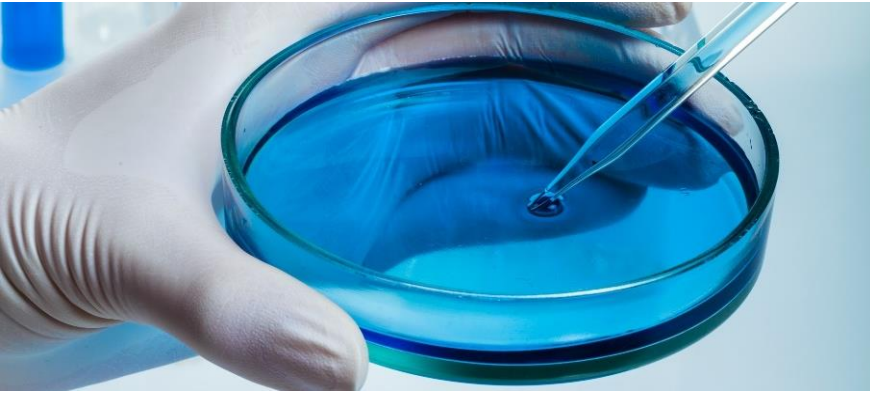
Tel: (+34) 91 737 1298

Fax: (+34) 91 310 1753

Email: info@lifelength.com



LIFE LENGTH



STUDY REPORT



LIFE LENGTH

17/12/2021

STUDY REPORT FOR BIOW

Telomerase activity analysis by QTRAP in cellular samples

Table of Contents

STUDY OBJECTIVE	1
1. TELOMERASE ACTIVITY DETERMINATION BY TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION	
PROTOCOL (Q-TRAP)	1
1.1 TECHNIQUE OVERVIEW	1
1.2 RESULTS	2
<i>Quality control parameters</i>	2
<i>Protein concentration</i>	2
<i>Telomerase Activity results</i>	2
<i>Data analysis</i>	4
1.3 OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS.....	4
2. REFERENCES	4

STUDY OBJECTIVE

Determination of telomerase activity in cellular samples

1. TELOMERASE ACTIVITY DETERMINATION BY TELOMERIC REPEAT AMPLIFICATION PROTOCOL (Q-TRAP)

1.1 TECHNIQUE OVERVIEW

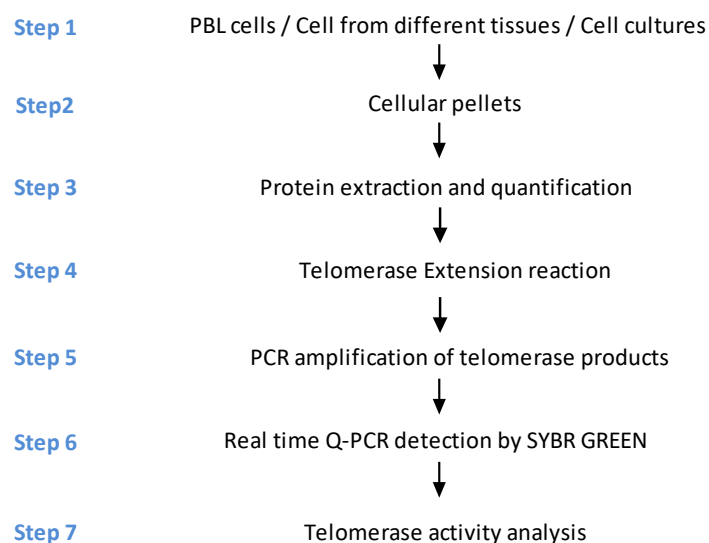
Life Length's (LL) Q-TRAP can measure relative telomerase activity by the Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP), modified for real-time, quantitative PCR analysis (Q-TRAP). This method has the advantages of exquisite sensitivity, rapidity, and a high-throughput format in respect to the regular TRAP assay. We assess telomerase enzyme activity in whole cell lysates from cell cultures. These samples are appropriately purified, pelleted and stored at -80 °C for optimal preservation.

The general mechanism of the Q-TRAP technique involves cellular pellets being lysed for protein extraction which is then subsequently quantified and stored under specific conditions to avoid protein degradation. Telomerase protein extracts are then incubated with a specific oligonucleotide substrate to allow the enzymatic addition of telomeric DNA repeats by endogenous telomerase.

Following the enzymatic reaction, telomerase extension products are then amplified and quantified by real-time qPCR. In real time PCR, a positive reaction is detected by accumulation of a fluorescent signal. The Ct (cycle threshold) is defined as the number of cycles required for fluorescence to cross the threshold (i.e.: exceeds background levels). The telomerase-positive standard dilution series is plotted against the telomere protein concentration ($r^2 > 0.9$) as a standard curve of Ct values.

To ensure that the data are both reproducible and quantitative, we routinely perform the assay in triplicate. The mean and standard deviation (SD) from each triplicate is calculated which include both positive (lymphoid cell line) and negative controls (inactivated by heat) are included.

Data are reported as **RTA (Relative Telomerase Activity)** and the general workflow scheme can be seen below.



1.2 RESULTS

Quality control parameters

Previous to plating and before conducting Q-TRAP protocol samples were assessed for:

- **Protein concentration:** Protein quantification is performed in each sample using Pierce™ BCA protein assay. A minimum of 0.3 µg/µl of protein concentration is required to proceed with the analysis of the samples to guarantee consistent results.
- **Regression Curve:** Internal controls are included and a regression analysis is performed for each run/plate. Those plates in which regression curves have an R² below 0.9 are repeated.
- **Replicates:** Samples with less than 2 valid replicates are discarded.
- **Cycle amplification:** Signals obtained after cycle #35 are considered unspecific amplification.

Protein concentration

Each sample was tested in triplicate.

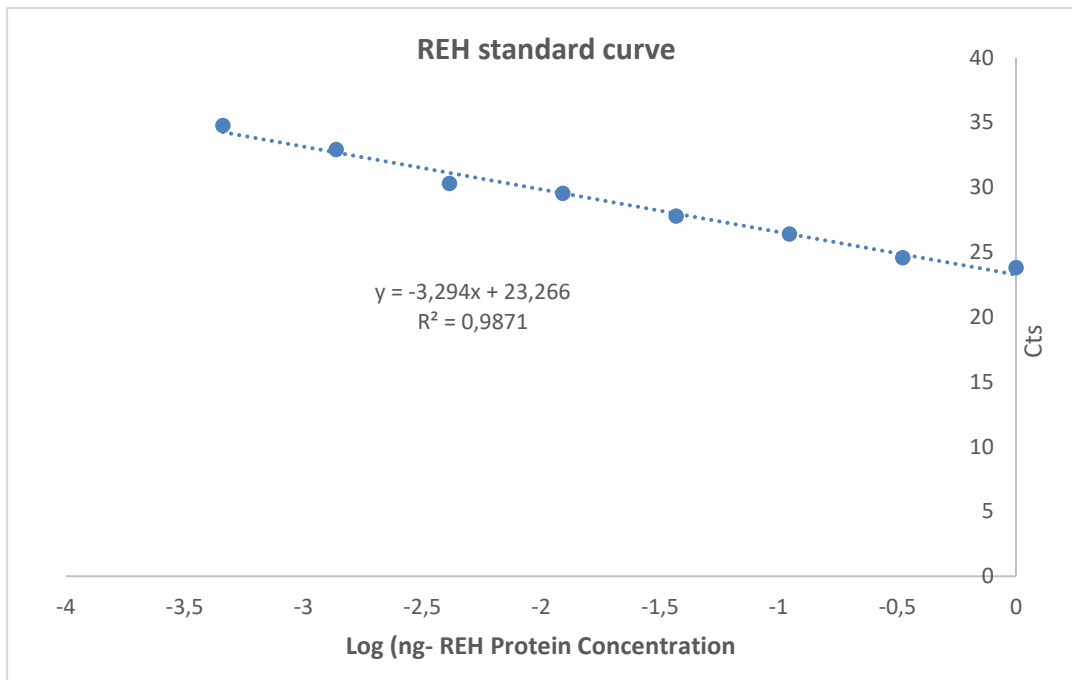
Table 1. Protein concentration results for samples analyzed by Q-TRAP.

Life Length ID	Client ID	Protein Conc. (µg/µl)
LLCR034037	T01-100	1.14
LLCR034038	T02-100	1.20
LLCR034039	T03-100	1.06
LLCR034040	T04-100	1.23
LLCR034041	T05-100	0.63
LLCR034042	T06-100	0.76
LLCR034043	T07-100	0.80
LLCR034044	T08-100	1.66
LLCR034045	T09-100	0.79
LLCR034046	T10-100	1.20
LLCR034047	T11-100	0.77
LLCR034048	T12-100	0.86

Telomerase Activity results

Standard curve results: generated by graphing Threshold cycles (Ct values) of REH cell line standard against log of 1000, 333, 111, 37, 12.3, 4.11, 1.37 and 45 ng of protein (whole cell extract).

Figure 1. Standard curve of Ct values of protein from REH cells against log of protein (ng). The cycle number at the threshold (Ct value) for each sample is interpolated in the curve, in order to calculate the relative telomerase activity (RTA).



Measurements were performed in triplicates to calculate coefficients of variation and mean amplification signals.

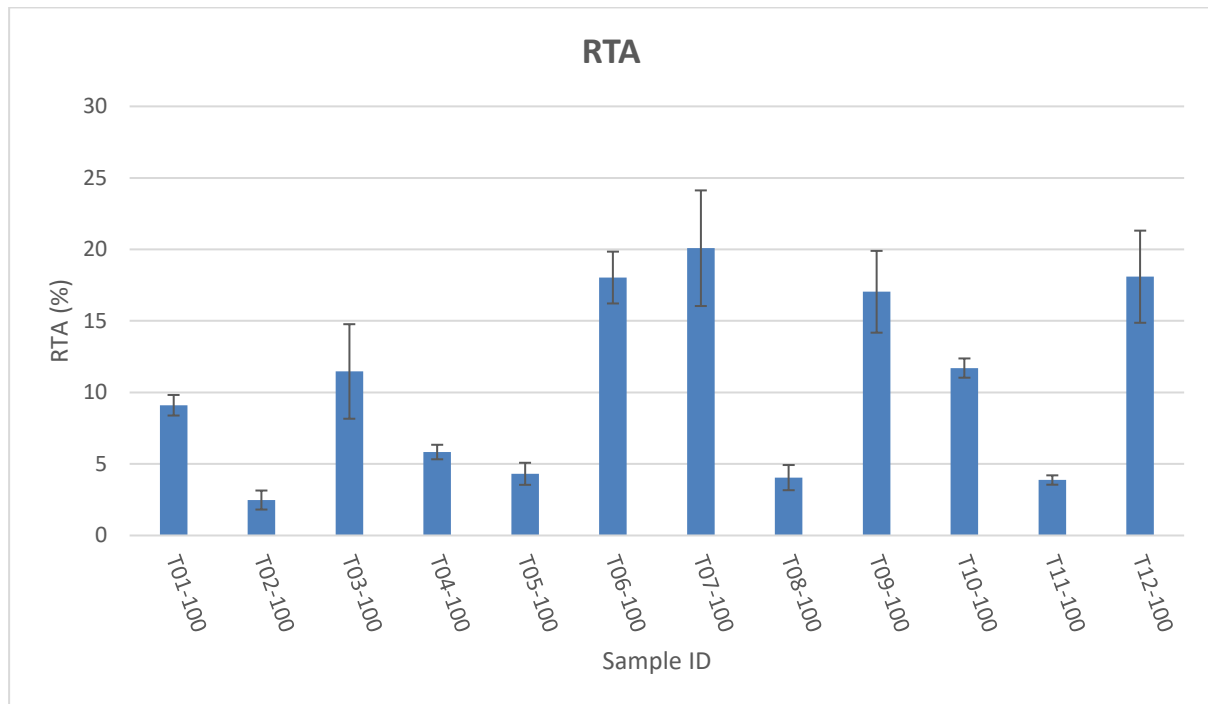
The table below summarize the individual data, mean and SD after normalization against Hela control reported as Relative Telomerase Activity (RTA) for each sample.

Table 2. RTA values for all samples analyzed.

Life Length ID	Client ID	RTA (%)	SD (%)
LLCR034037	T01-100	9.11	0.72
LLCR034038	T02-100	2.48	0.66
LLCR034039	T03-100	11.47	3.31
LLCR034040	T04-100	5.83	0.51
LLCR034041	T05-100	4.31	0.77
LLCR034042	T06-100	18.03	1.81
LLCR034043	T07-100	20.08	4.04
LLCR034044	T08-100	4.05	0.88
LLCR034045	T09-100	17.04	2.86
LLCR034046	T10-100	11.70	0.67
LLCR034047	T11-100	3.88	0.33
LLCR034048	T12-100	18.09	3.22

Data analysis

Figure 2. Graphical representation of Q-TRAP results (RTA) for all samples.



A statistical analysis of the results is included in the excel file provided with this report.

1.3 OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS

- Protein extraction yields from all samples rendered suitable conception of protein (> 0.3 µg/µl) to perform the Q-TRAP assay.
- The regression curve's coefficient of determination (REH Cells) was higher than 0.9 ($R^2 = 0.99$).
- Sample T07-100 shows the highest telomerase activity levels, while sample T11-100 has the lowest telomerase activity values among all the samples.
- The telomerase activities levels found in all the samples are basal (< 20%).

2. REFERENCES

- Lorenzo Galluzzi et al. (eds), Cell Senescence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol 965, DOI 10.1007/978-1-62703-239-1_14, © Springer Science+Business Media, LLC 2013.
- Herbert B., Hochreiter AE, Wright WE, Shay JW (2006). Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol. Nature Protocols, 1(3):1583-90.



LIFE LENGTH

Life Length is the leader in telomere diagnostics with offerings at the forefront of cutting edge technology.

For any clarifications or questions regarding the study results, please do not hesitate to contact us.

Visit us at: www.lifelength.com

CONTACT INFO

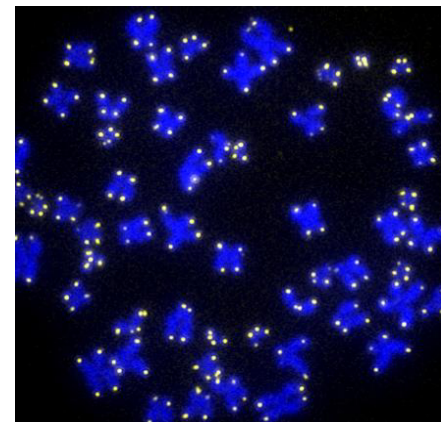
Life Length

C/Miguel Angel, 11 – 2nd floor
28010 – Madrid, Spain

Tel: (+34) 91 737 1298

Fax: (+34) 91 310 1753


Email: info@lifelength.com



 LIFE LENGTH

STUDY REPORT

bio:w

 LIFE LENGTH

27/03/2022

STUDY REPORT FOR BIOW

Telomere length analysis by TAT in cellular samples

Table of contents

STUDY OBJECTIVE.....	2
1. TELOMERE LENGTH DETERMINATION BY TELOMERE ANALYSIS TECHNOLOGY® (TAT).....	2
1.1 TECHNIQUE OVERVIEW	2
1.2 TECHNOLOGY VALIDATION	2
1.3 RESULTS.....	3
<i>Quality control parameters</i>	3
<i>Cell count and viability results</i>	4
<i>Telomere length results from TAT analysis</i>	5
1.4 DATA ANALYSIS.....	7
<i>Extended Telomere Associated Variables (TAVs) analysis</i>	7
1.5 OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS.....	8
<i>Quality Control results</i>	8
<i>TAT results and statistical analysis</i>	8
<i>TAV Analysis</i>	8
2. REFERENCES	14
3. ANNEX I	15

STUDY OBJECTIVE

Determination of telomere length variables in cellular samples

1. TELOMERE LENGTH DETERMINATION BY TELOMERE ANALYSIS TECHNOLOGY® (TAT)

1.1 TECHNIQUE OVERVIEW

For the measurement of the median telomere length of any cell line, Life Length (LL) uses a high-throughput (HT) Q-FISH technique. This method is based on a quantitative fluorescence *in-situ* hybridization method modified for cells in interphase. In brief, telomeres are hybridized with a fluorescent Peptide Nucleic Acid probe (PNA) that recognizes three telomere repeats (sequence: Alexa488-OO-CCCTAACCTAACCTAA, Panagene). The images of the nuclei and telomeres are captured by a high-content screen system (see below). The intensity of the fluorescent signal from the telomeric PNA probes that hybridize to a given telomere is proportional to the length of that telomere. The intensities of fluorescence are translated to base pairs through a standard regression curve which is generated using control cell lines with known telomere length.

Sample Preparation and HT Q-FISH: On processing day, the samples and control cell lines frozen in liquid nitrogen are thawed at 37°C and cell counts and cellular viability are determined. Aliquots with viability lower than 60% are considered below our QC standards and are not further analyzed. Cells are seeded in clear bottom black-walled 384-well plates at the density of 15,000 cells per well with 5 replicates of each sample and 8 replicates of each control cell line. Cells are fixed with methanol/acetic acid (3/1, vol/vol). Once these cells have fixed onto the plate, they are treated with pepsin to digest the cytoplasm and the nuclei are processed for *in situ* hybridization with the PNA probe. After several washing steps following standard DAPI incubation for DNA staining, the wells are filled up with mounting medium and the plate is stored overnight at 4°C.

HT Microscopy: Quantitative image acquisition and analysis is performed on a High Content Screening Opera Phenix System (Perkin Elmer), using the Columbus software, Version 2.9 (Perkin Elmer). Images are captured, using a 40 x 0.95 NA water immersion objective. UV and 488 nm excitation wavelengths are used to detect the DAPI and A488 signals respectively. With constant exposure settings, 15 independent images are captured at different positions for each well. Next, the nuclei images are used to define the region of interest for each cell, measuring telomere fluorescence intensity of the A488 image in all of them. The results of intensity for each foci are exported to the Columbus 2.4 software (Perkin Elmer). Telomere length distribution and median telomere length are calculated with Life Length's proprietary algorithms. Statistical analysis of the data was performed using T-Student test.

1.2 TECHNOLOGY VALIDATION

The TAT technology has been validated for the following parameters:

Accuracy: The establishment of a correspondence between TAT fluorescence intensity values and telomere length measurements is achieved by performing TRF (Terminal Restriction Fragmentation) in six human lymphocyte cell lines (Calibration / Method Comparison).

The same set of samples is analyzed both by TAT and by the TRF reference method (Definition of TAT Systemic Error).

VALIDATION DATA shows a correlation of 0.99.

Precision: Serial analysis of the median telomere length values is performed on a human lymphocyte sample in different runs, days and plate positions in order to define TAT Random Error parameters (Standard Deviation, Variance).

Limit of Detection and Specificity: Definition of image analysis algorithms and protocol settings exist that define the lowest significant spot intensities and avoid interference by nonspecific fluorescence signals.

Median Reportable Range: Analysis of median telomere length of 6 cell lines is performed that covers our reportable range and defines its lower and upper limits.

VALIDATION DATA fix lower level at 4,700 base pairs and upper level at 14,400 base pairs.

Reference Range: Analysis of median telomere length have been conducted in hundreds of human samples in order to define the TAT Reference Range and its percentiles (5th, 10th, 25th, 50th, 75th and 95th) for different ages.

VALIDATION DATA established population curves - normal population data base from 18 to 85 years, to extrapolate patients' data and generate reports.

1.3 RESULTS

Quality control parameters

Previous to plating and before conducting the TAT protocol, the samples were assessed for:

- **Cell count:** An automated cell counter is used to determine the total number of cells in the vials.
- **Cell viability** by Tripan-Blue exclusion method.
- **Regression Curve:** Internal controls are included and a regression analysis is performed for each run/plate. The plates are repeated if their regression curves have an R² below 0.92.
- **Imaging analysis filters:** Data are filter-Homogenized after imaging analysis discarding spurious data, outliers and no-representative images of the sample.
- **Replicates:** After seeding and once TAT is completed:
 - Samples should have a Coefficient of Variation (CV) below 10%.
 - Samples with less than 3 valid replicates at the end of the analysis are discarded.
 - Spot number analyzed per sample should be higher than 10,000.

Cell count and viability results

Table 1: Concentration and viability of samples after thawing.

Life Length ID	Client ID	Cell Conc. (cells/mL)	Viability (%)
LLCR034001	T01-B1	3100000	90
LLCR034002	T02-B1	2500000	88
LLCR034003	T03-B1	2100000	73
LLCR034004	T04-B1	3700000	89
LLCR034005	T05-B1	2300000	92
LLCR034006	T06-B1	3000000	74
LLCR034007	T07-B1	1800000	92
LLCR034008	T08-B1	3100000	96
LLCR034009	T09-B1	3200000	91
LLCR034010	T10-B1	3300000	92
LLCR034011	T11-B1	2600000	89
LLCR034012	T12-B1	2400000	67
LLCR034013	T01-B2	3200000	89
LLCR034014	T02-B2	3800000	79
LLCR034015	T03-B2	2600000	76
LLCR034016	T04-B2	3500000	86
LLCR034017	T05-B2	3800000	81
LLCR034018	T06-B2	4000000	90
LLCR034019	T07-B2	2000000	93
LLCR034020	T08-B2	1700000	81
LLCR034021	T09-B2	2800000	90
LLCR034022	T10-B2	2400000	92
LLCR034023	T11-B2	3900000	93
LLCR034024	T12-B2	3500000	83
LLCR034025	T01-B3	3400000	81
LLCR034026	T02-B3	2300000	82
LLCR034027	T03-B3	3100000	93
LLCR034028	T04-B3	2800000	95
LLCR034029	T05-B3	1900000	79
LLCR034030	T06-B3	3500000	89
LLCR034031	T07-B3	2800000	85
LLCR034032	T08-B3	1500000	74
LLCR034033	T09-B3	3100000	76
LLCR034034	T10-B3	2100000	78
LLCR034037	T01-100	1800000	86
LLCR034038	T02-100	2200000	70
LLCR034039	T03-100	1900000	87
LLCR034040	T04-100	2400000	84

LLCR034041	T05-100	3300000	85
LLCR034042	T06-100	2100000	86
LLCR034043	T07-100	3500000	73
LLCR034044	T08-100	3900000	88
LLCR034045	T09-100	1300000	86
LLCR034046	T10-100	3600000	84
LLCR034047	T11-100	2700000	79
LLCR034048	T12-100	1800000	75

Telomere length results from TAT analysis

The following table shows the median telomere length (MTL) and 20th percentile telomere length (both in base pairs - bp) for each sample as well as the percentage of short telomeres. The latter is defined as the percentage of the telomeres with a length below 3 Kbp (<3 Kbp). All measurements were performed in quintuplicate.

Table 2. Telomere length results from TAT analysis.

Life Length ID	Client ID	Median Telomere Length (bp)	20 th Percentile Length (bp)	Telomeres <3 Kbp (%)	CV (%)
LLCR034001	T01-B1	11002	7282	3.1	2.3
LLCR034002	T02-B1	11308	7627	2.4	1.0
LLCR034003	T03-B1	9900	6246	5.0	1.0
LLCR034004	T04-B1	11976	8321	1.8	1.5
LLCR034005	T05-B1	10190	6472	4.7	0.1
LLCR034006	T06-B1	9823	6002	6.2	1.3
LLCR034007	T07-B1	10035	6309	5.1	1.3
LLCR034008	T08-B1	11572	7762	2.3	1.6
LLCR034009	T09-B1	10160	6331	5.1	2.6
LLCR034010	T10-B1	10896	7207	3.3	2.1
LLCR034011	T11-B1	11070	7379	2.8	2.2
LLCR034012	T12-B1	11721	7907	2.2	1.3
LLCR034013	T01-B2	11304	7558	2.6	2.3
LLCR034014	T02-B2	10845	7088	3.3	0.2
LLCR034015	T03-B2	9873	6161	5.2	0.8
LLCR034016	T04-B2	12166	8525	1.5	1.3
LLCR034017	T05-B2	10852	7142	3.4	2.5
LLCR034018	T06-B2	10552	6747	4.2	0.6
LLCR034019	T07-B2	10374	6631	4.4	1.9
LLCR034020	T08-B2	11366	7679	2.4	1.6
LLCR034021	T09-B2	10308	6538	4.4	2.2
LLCR034022	T10-B2	10177	6473	4.8	1.6
LLCR034023	T11-B2	10670	7012	3.3	1.4
LLCR034024	T12-B2	12060	8242	1.8	2.3

LLCR034025	T01-B3	11335	7512	2.7	4.8
LLCR034026	T02-B3	11250	7458	2.7	0.4
LLCR034027	T03-B3	10207	6387	4.9	1.1
LLCR034028	T04-B3	11856	8132	2.0	1.1
LLCR034029	T05-B3	10632	6897	3.8	1.4
LLCR034030	T06-B3	10012	6170	5.7	1.0
LLCR034031	T07-B3	9677	5962	6.0	2.0
LLCR034032	T08-B3	10610	6934	3.5	3.3
LLCR034033	T09-B3	10059	6184	5.5	3.4
LLCR034034	T10-B3	10503	6827	3.9	1.1
LLCR034037	T01-100	11128	7326	2.8	2.0
LLCR034038	T02-100	11058	7274	3.0	3.7
LLCR034039	T03-100	10612	6861	3.7	1.6
LLCR034040	T04-100	12187	8436	1.6	2.3
LLCR034041	T05-100	10577	6816	3.9	1.1
LLCR034042	T06-100	10267	6400	5.2	1.8
LLCR034043	T07-100	10458	6682	4.0	0.3
LLCR034044	T08-100	11353	7553	2.6	1.3
LLCR034045	T09-100	9893	6102	5.5	3.1
LLCR034046	T10-100	10415	6703	4.4	1.4
LLCR034047	T11-100	10438	6794	3.9	1.9
LLCR034048	T12-100	11486	7756	2.3	1.7

1.4 DATA ANALYSIS

Please find the graphical representations of the results in ANNEX I.

A statistical analysis of the results is included in the excel file provided with this report.

Extended Telomere Associated Variables (TAVs) analysis.

Telomere Length Percentiles

Percentile is the point in a distribution at which a given percentage of determined values or scores is found. The telomere length percentiles comprise of one hundred individual telomere length measurements per sample including the length of the shortest telomeres in the sample (1st percentile length) and the length of the longest telomeres (100th percentile length). The percentiles allow for a comprehensive comparison between all the telomere lengths present in each sample throughout the telomere length distribution.

Percentages of telomeric length values - ShortTel

The ShortTel variables are the percentages (%) of telomeres with a specific telomere length (in 500 bp intervals). For example, ShortTel 1000 indicates the percentage of telomeres that have a length between 500-1000 bp.

The ShortTel variables help identify whether one sample has a higher percentage (quantity) of shorter or longer telomeres as well as detect differences between samples in a specific area of the distribution.

Percentages of cells with specific telomere values - ShortCell

The ShortCell variables are the percentages of cells with a specific average telomere length (in 500 bp intervals). With the ShortCell variables it can be detected whether a sample presents a higher percentage of cells with shorter telomeres or longer ones. For example, ShortCell 1000 is the percentage of cells that have an average telomere length between 500- 1000 bp.

Please find the full TAV analysis in the excel file provided with this report.

1.5 OBSERVATIONS AND CONCLUSIONS

Quality Control results

- The standard regression curve's coefficient of determination R^2 for the plates analyzed met our quality control standards ($R^2 > 0.92$).
- More than 10,000 telomeres were analyzed for all samples.

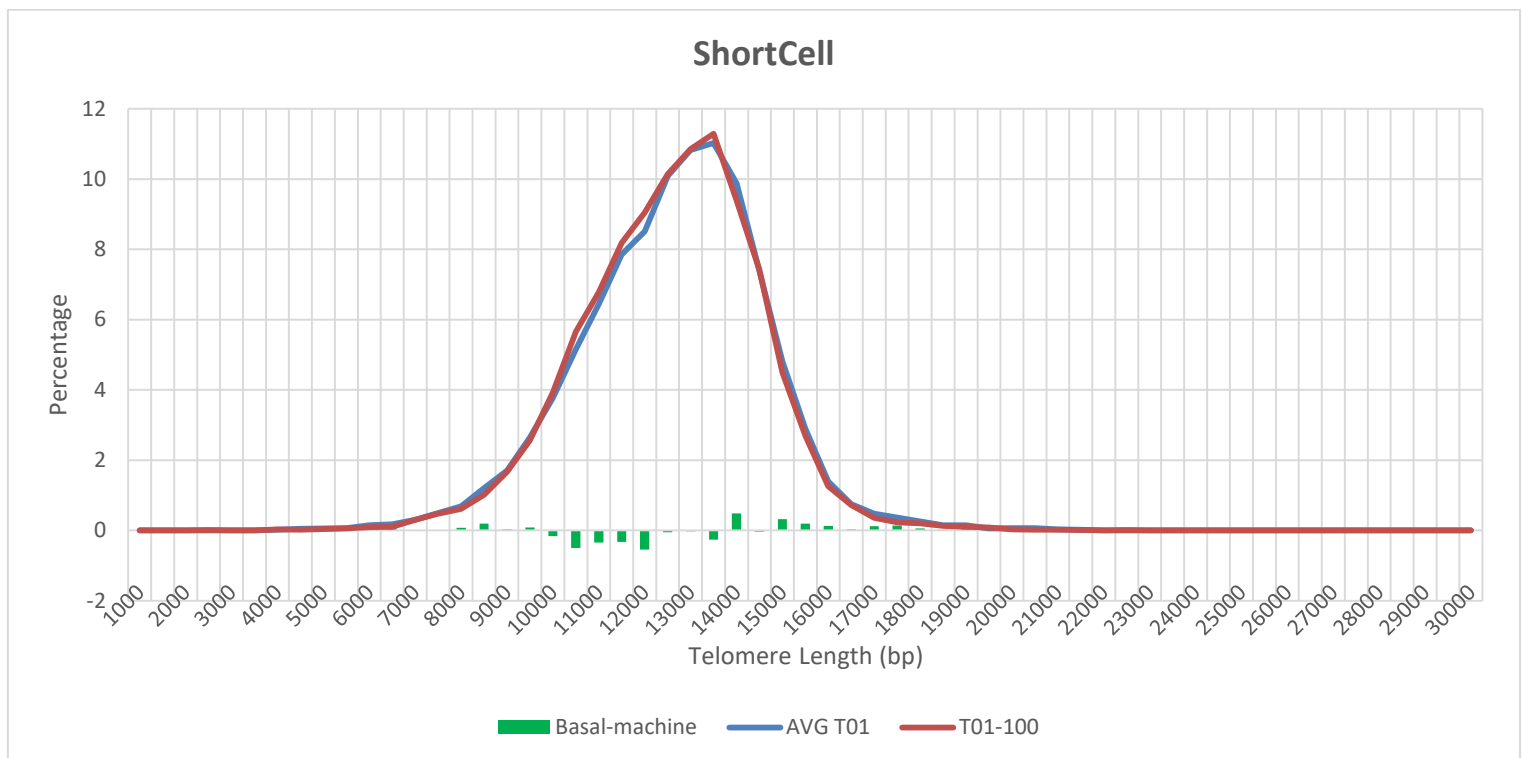
TAT results and statistical analysis

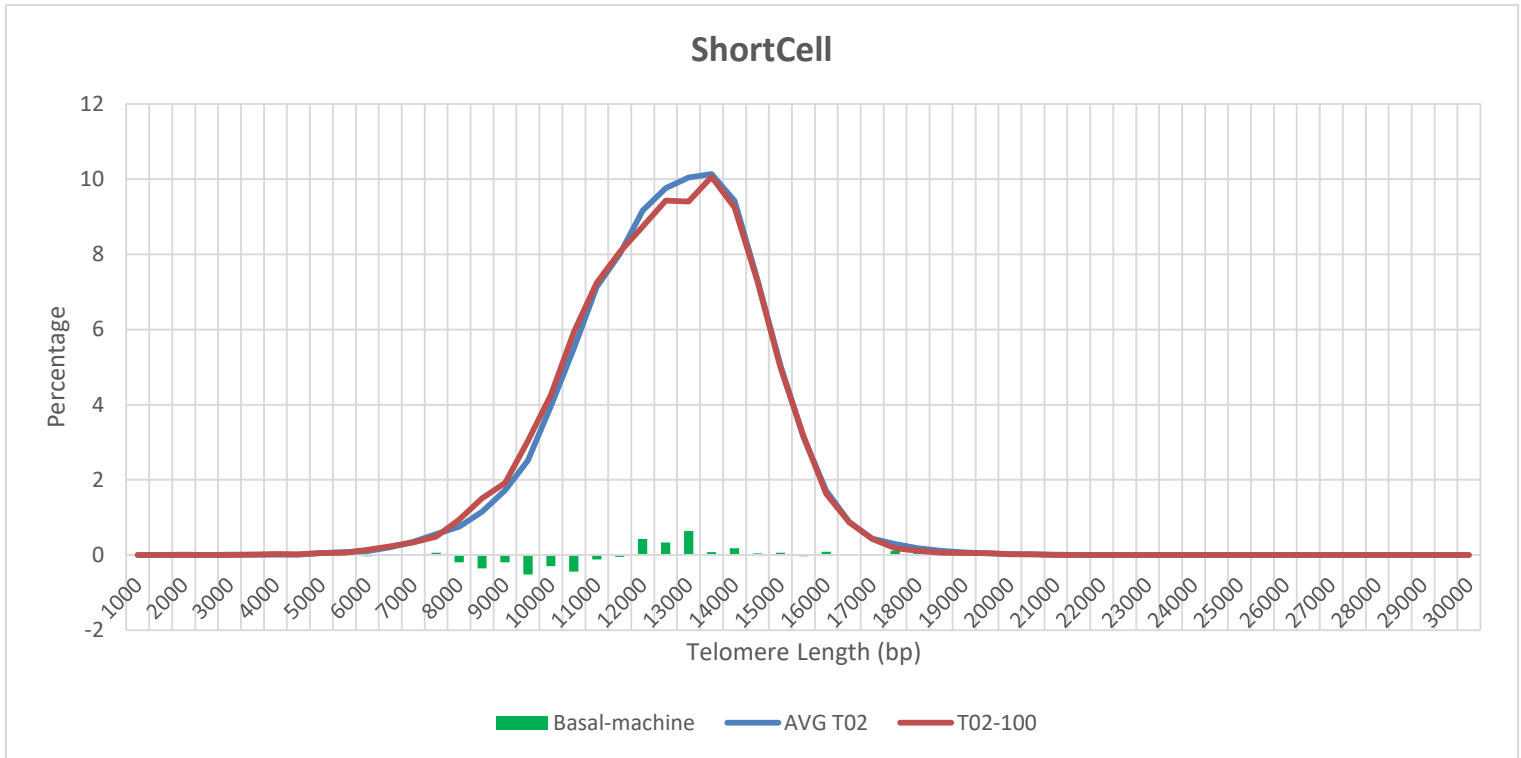
- Various differences were detected between the samples not only in the standard variables (Median telomere length, 20th percentile length and % of telomeres < 3 Kbp) but also in the extended telomere associated variables included in the excel file provided with this report.
- The statistical analysis for the standard variables, detected various significant differences as it can be seen in the complementary excel file.

TAV Analysis

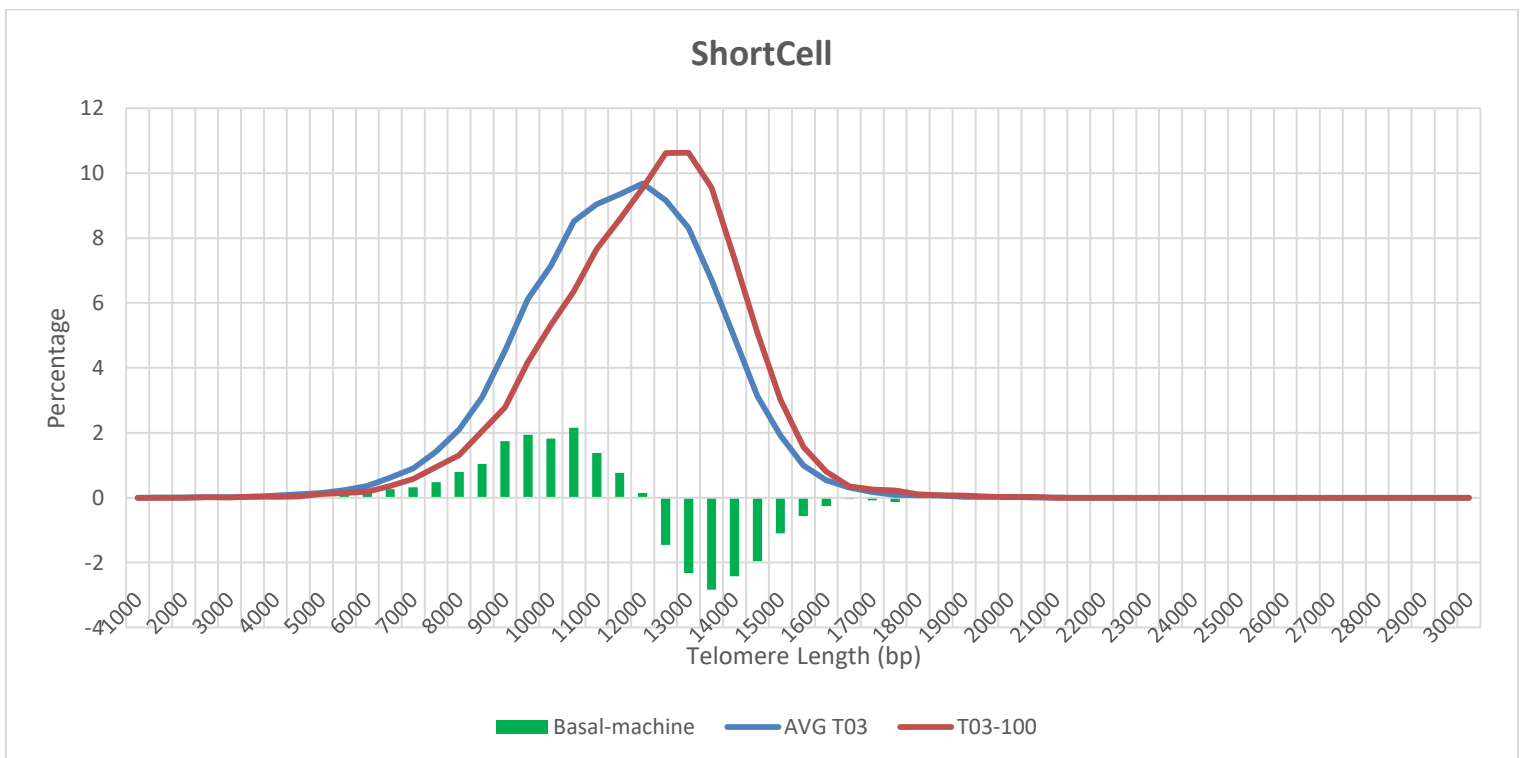
- The complete TAV analysis can be found in the excel file provided with this report.
- In order to identify potential changes in the cellular profile of the participants, before and after the treatment, an analysis was performed using the ShortCell variables. From the initial three basal (pre-treatment) measurements the average (AVG) ShortCell values were calculated and then were used to compare with the ShortCell values at time point 100 days and after the treatment was applied. If we compare per couple, we obtain the following results:

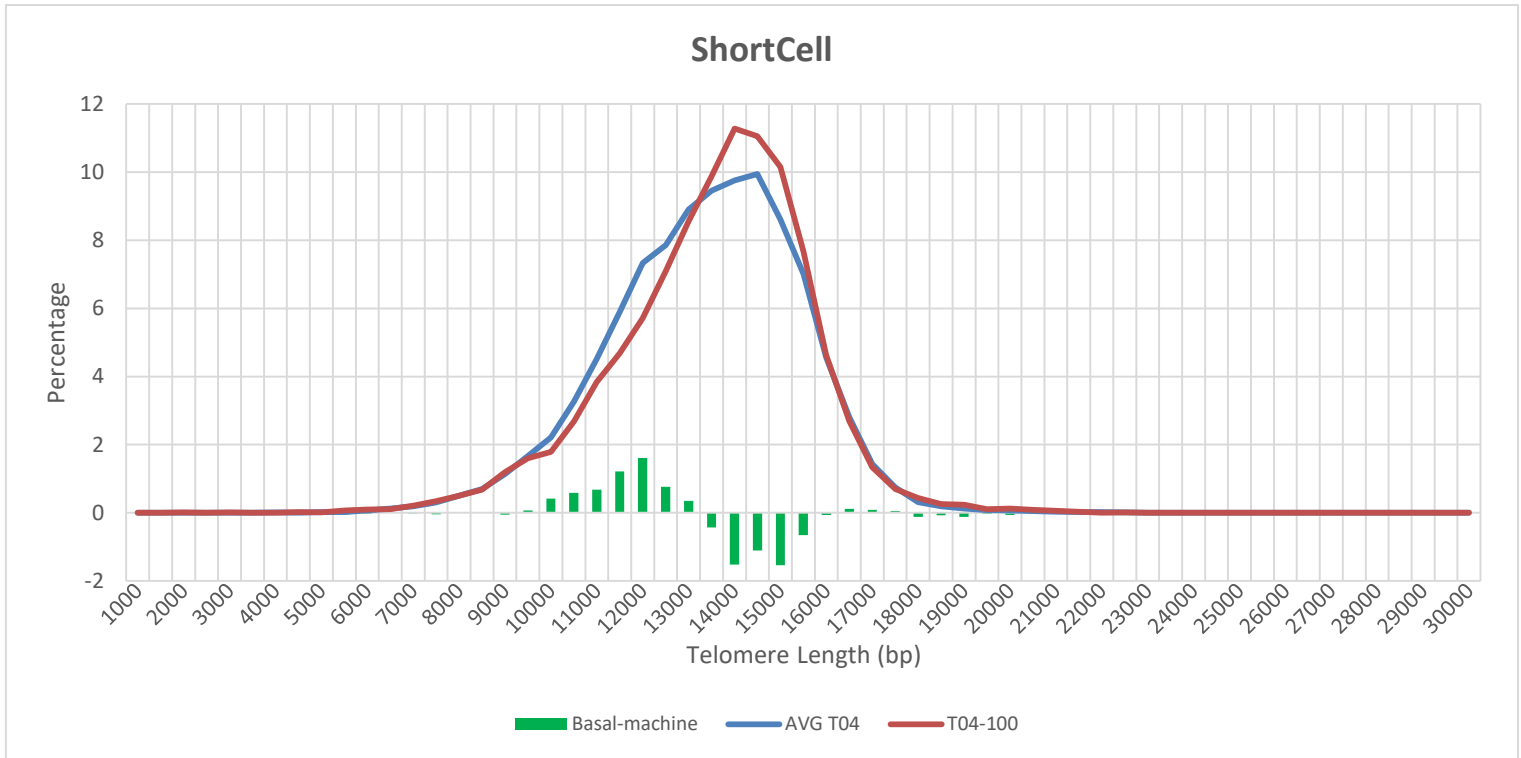
Couple 1. No particular differences were identified in the telomeric cellular profiles.



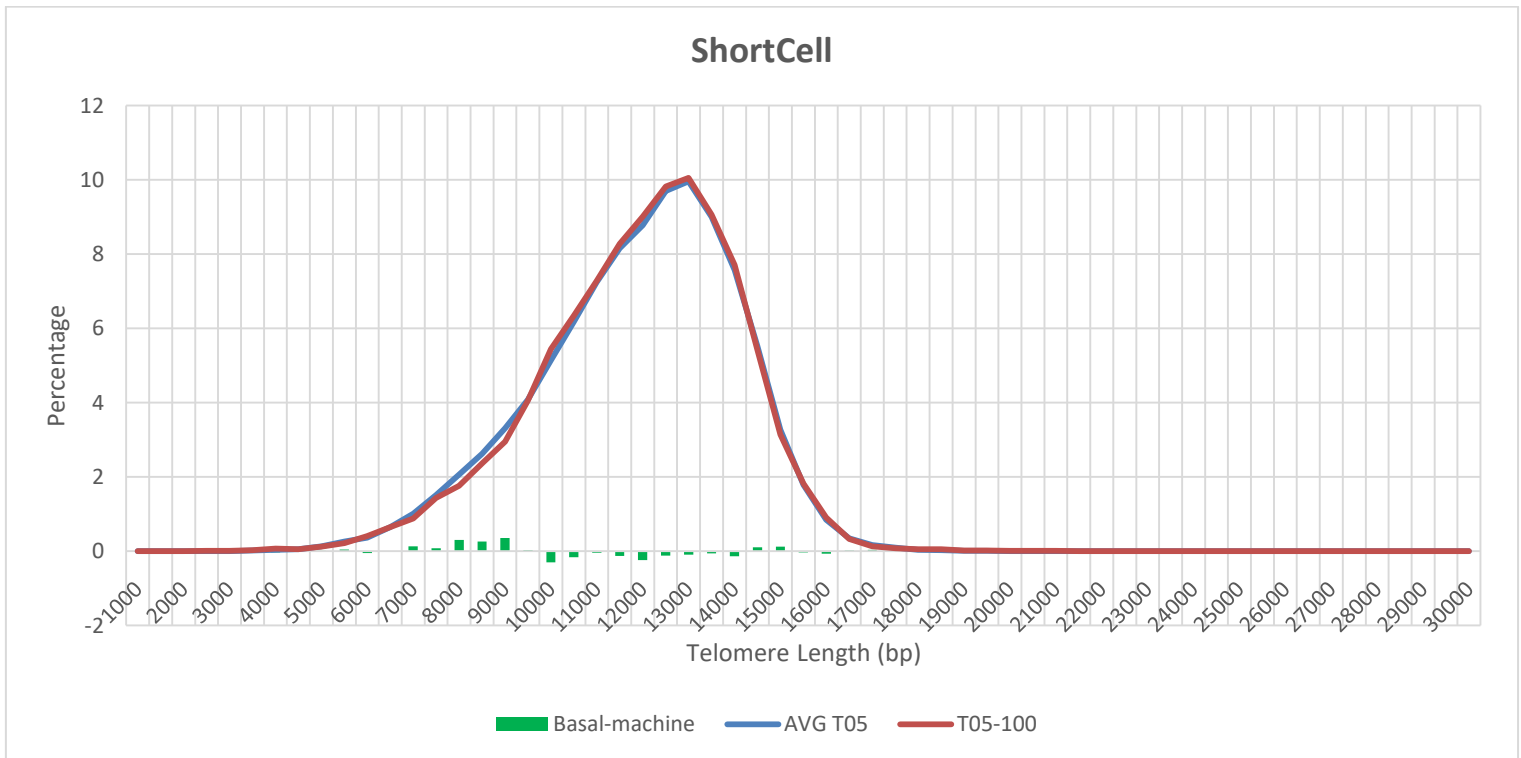


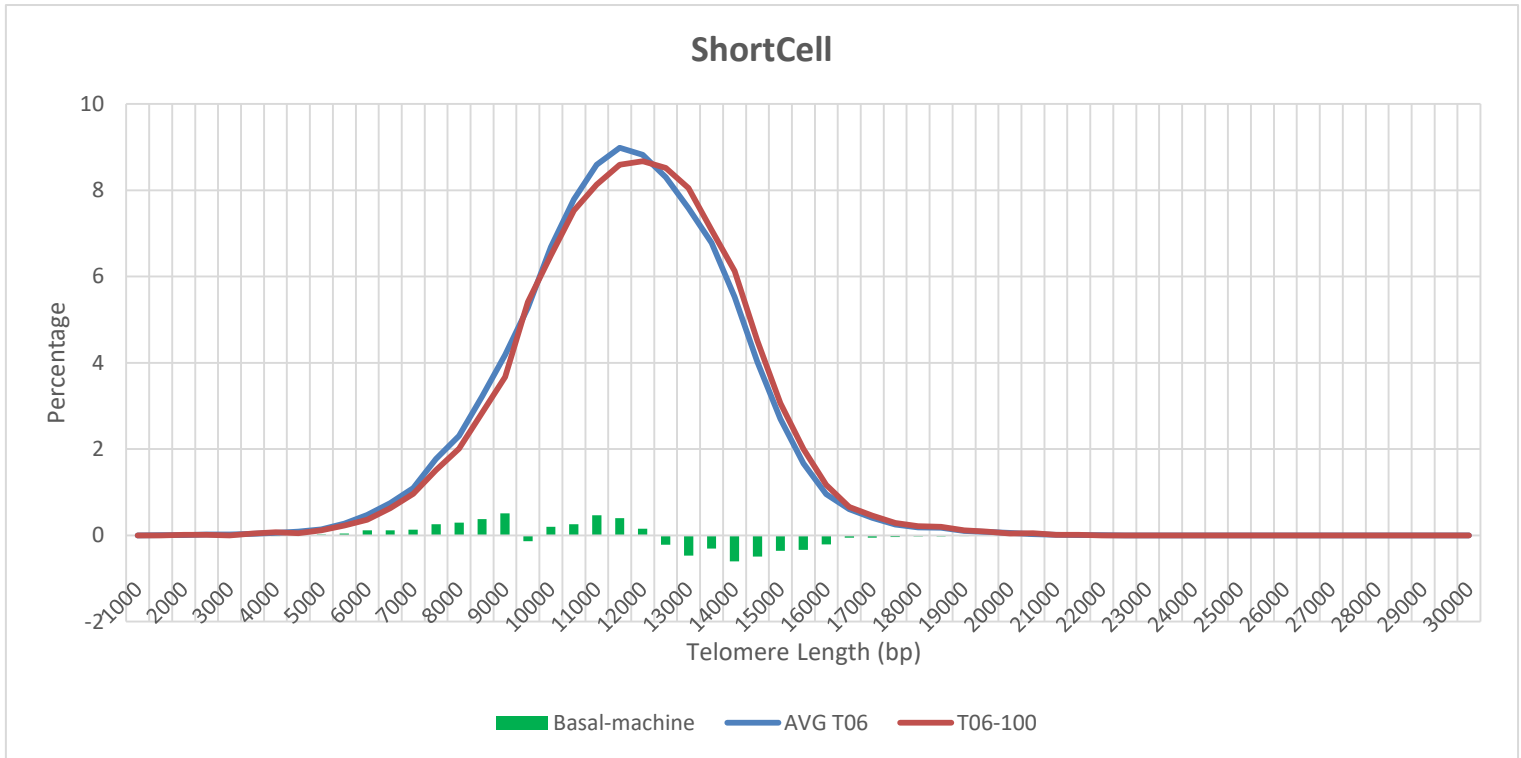
Couple 2. Both participants showed an improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (100 day graph shifts to the right compared to the AVG baseline).



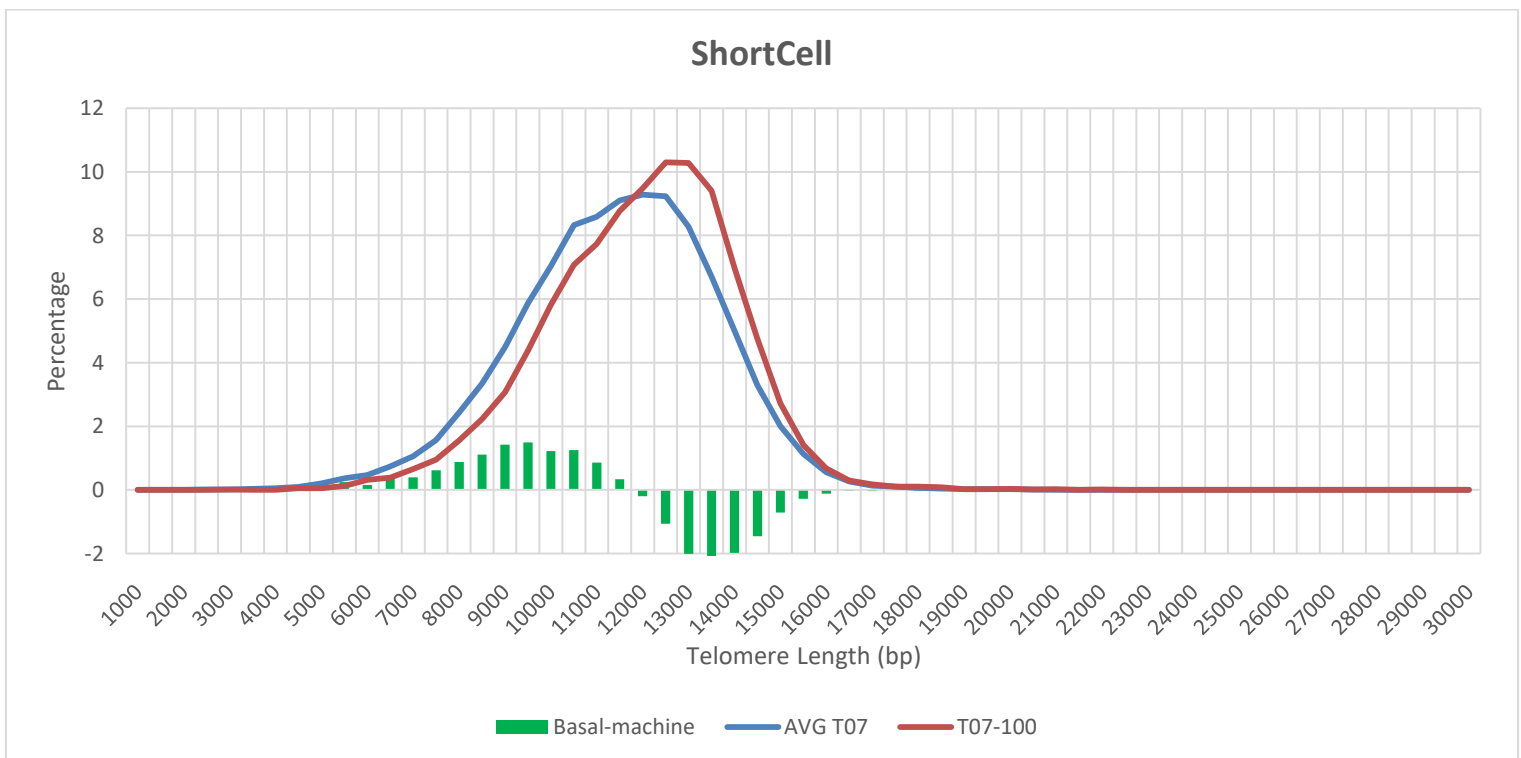


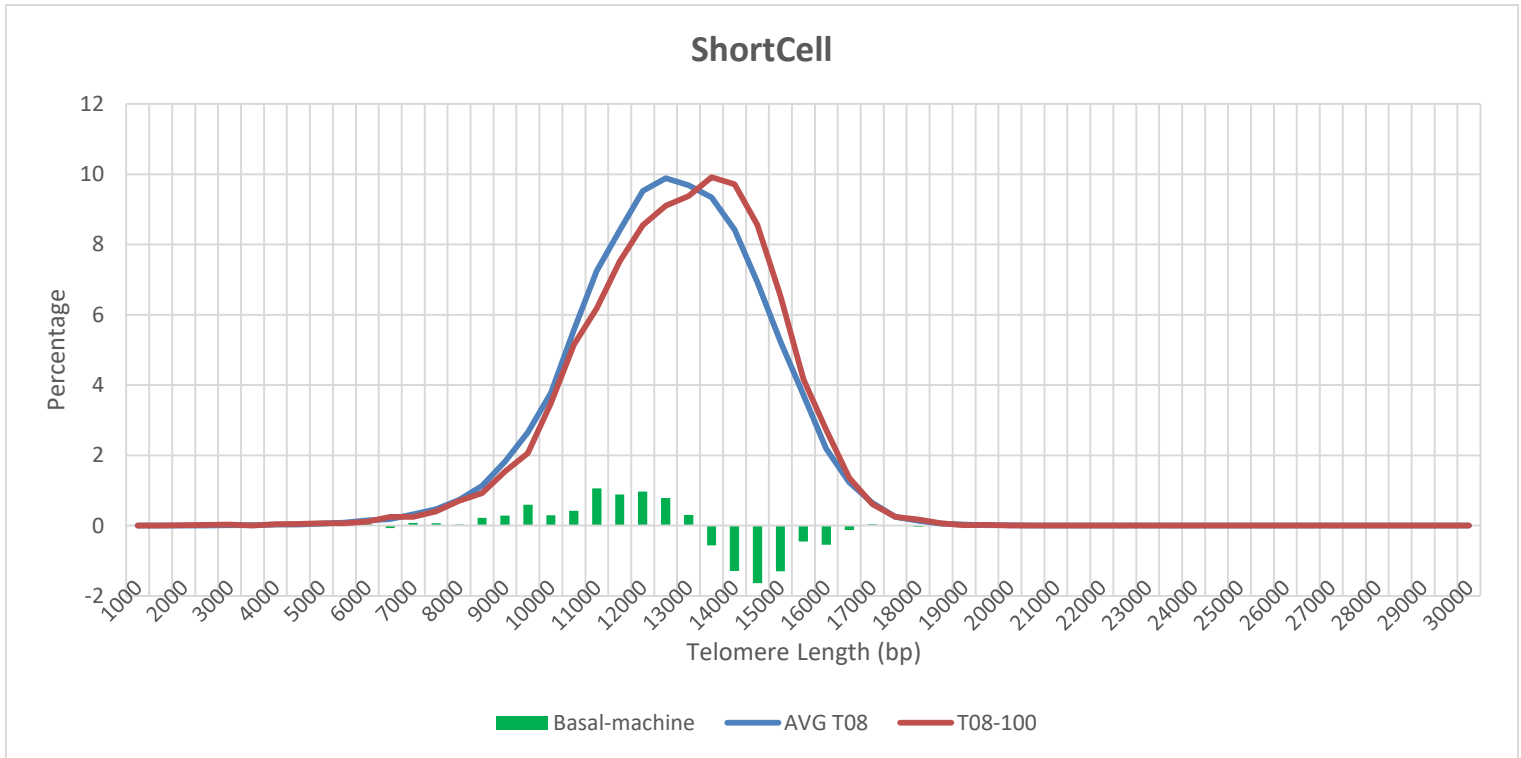
Couple 3. No particular differences were identified in these telomeric cellular profile of participant 05. Participant 6 showed a slightly improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (100 day graph shifts to the right compared to the AVG baseline).



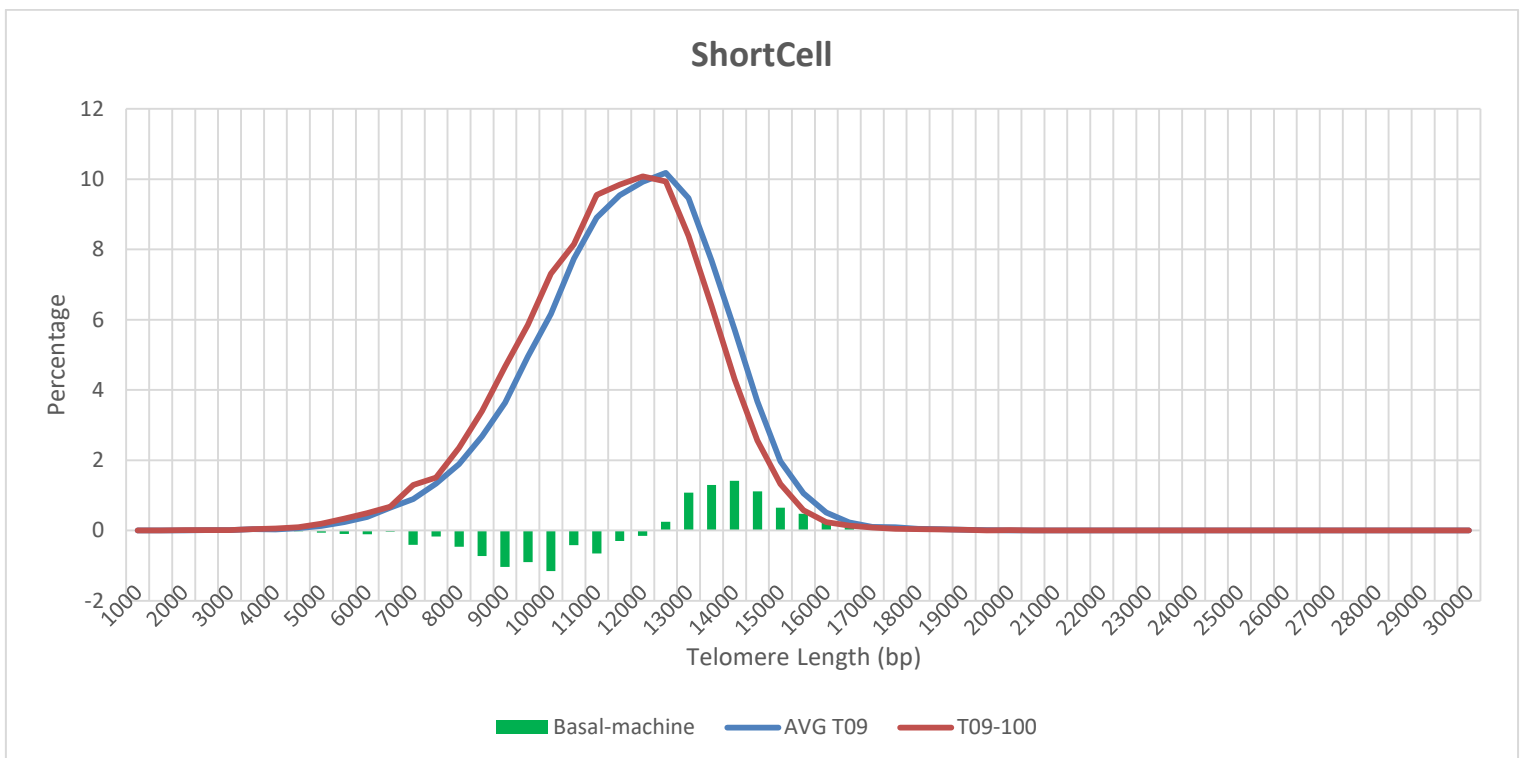


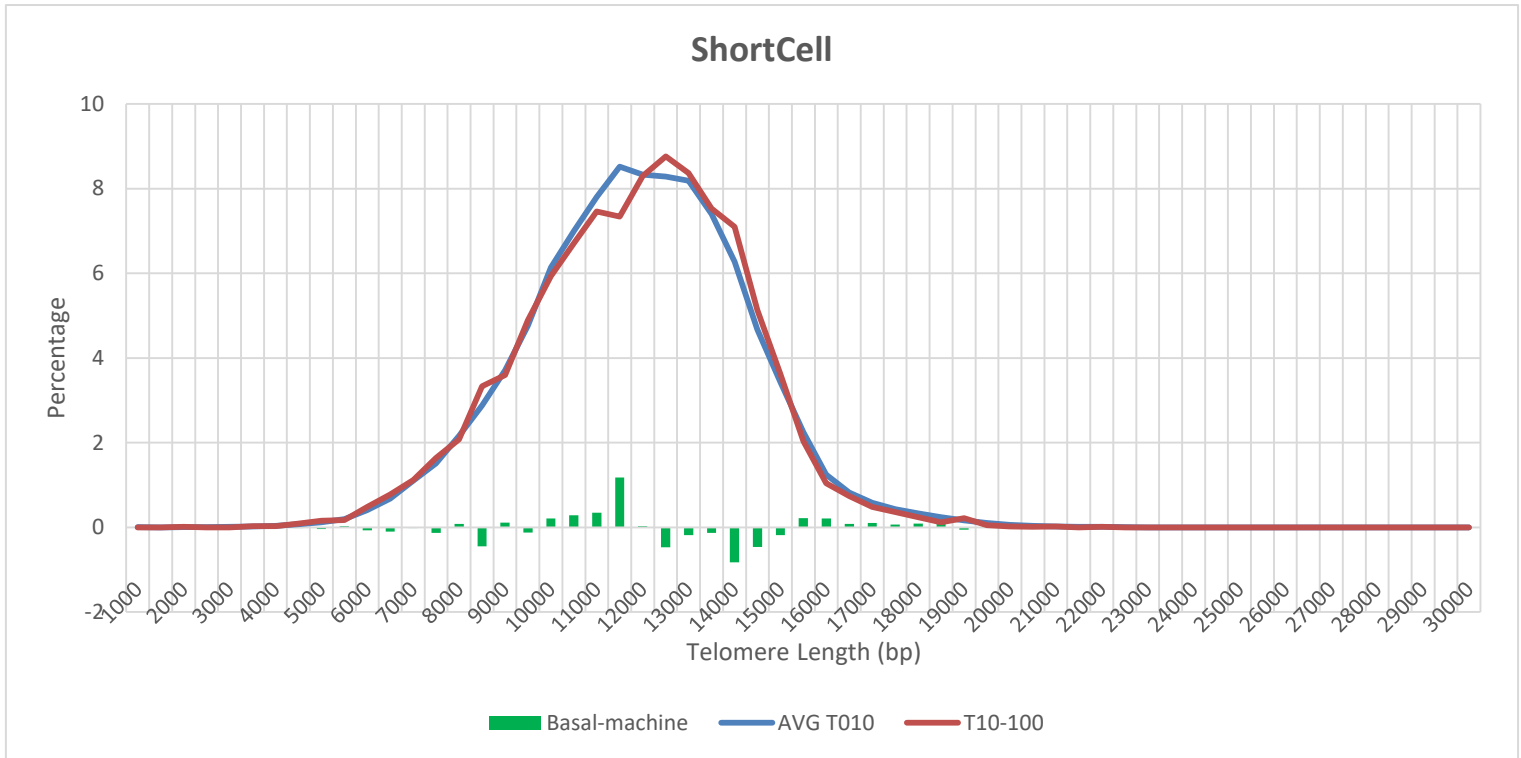
Couple 4. Both participants showed an improved cellular-telomeric profile after 100 days of treatment (red graph shifts to the right compared to the blue one).



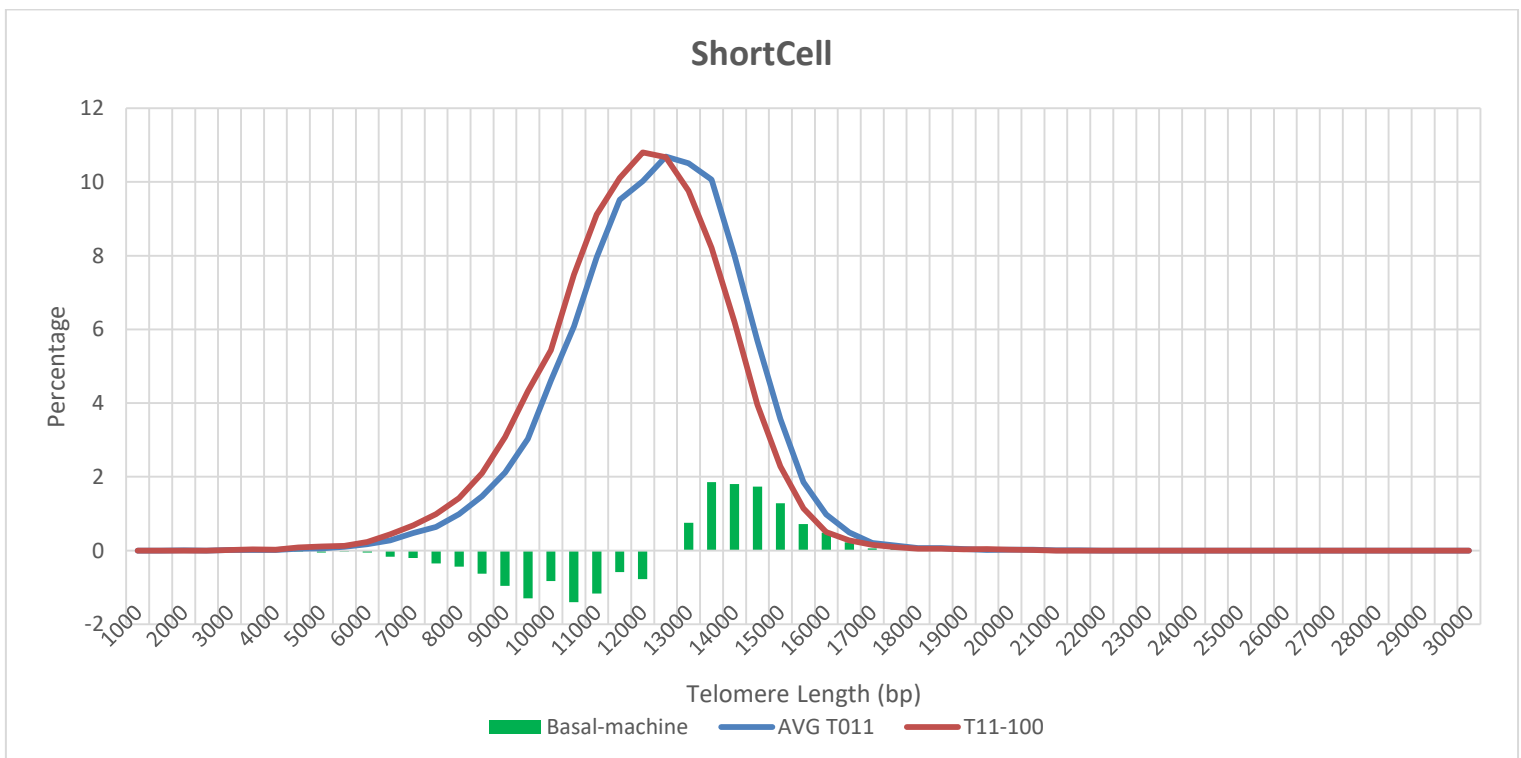


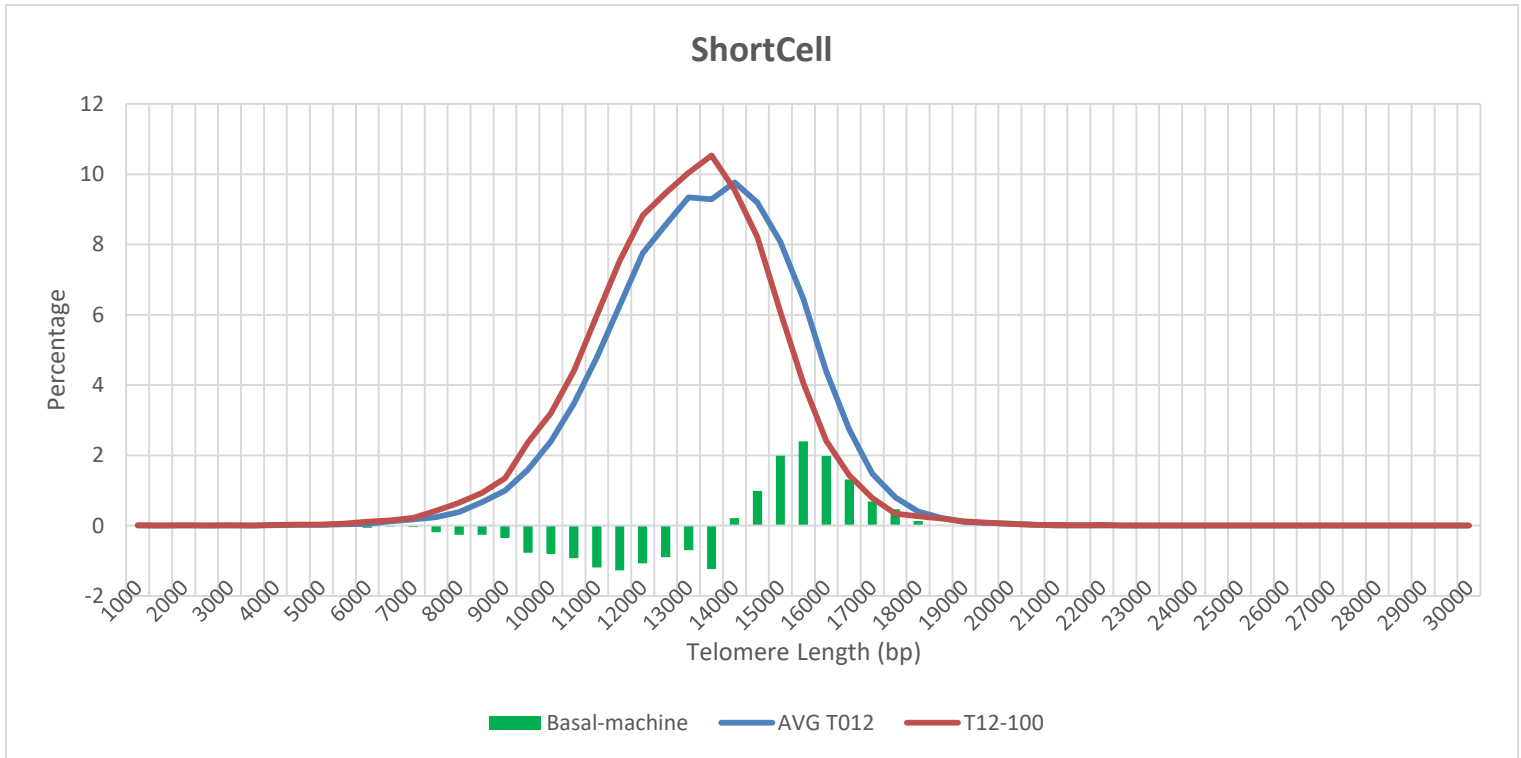
Couple 5. For participant 09 the telomeric profile at baseline was found to be better than the profile identified after 100 days. For participant 10 there are small differences only in certain areas of the distribution. These differences suggest a very small improvement after the treatment.





Couple 6. For both of these participants the telomeric profiles at baseline were found to be better than the profiles identified after 100 days.



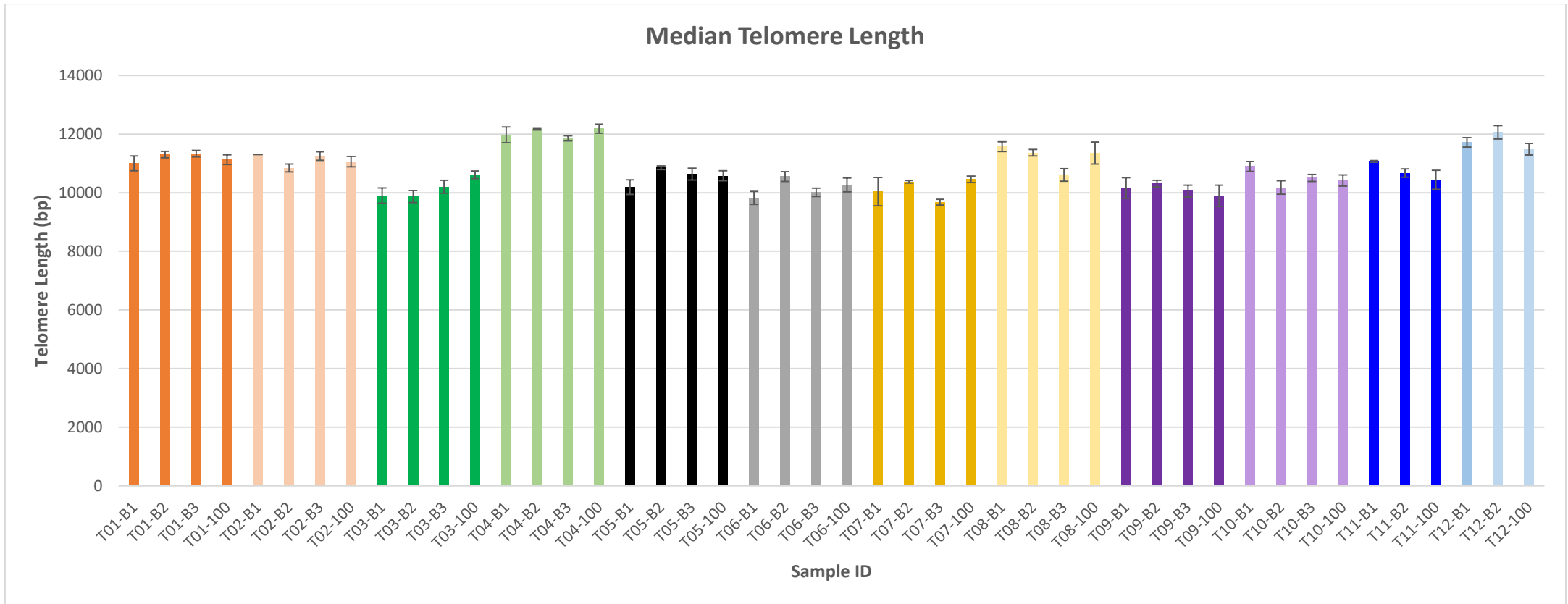


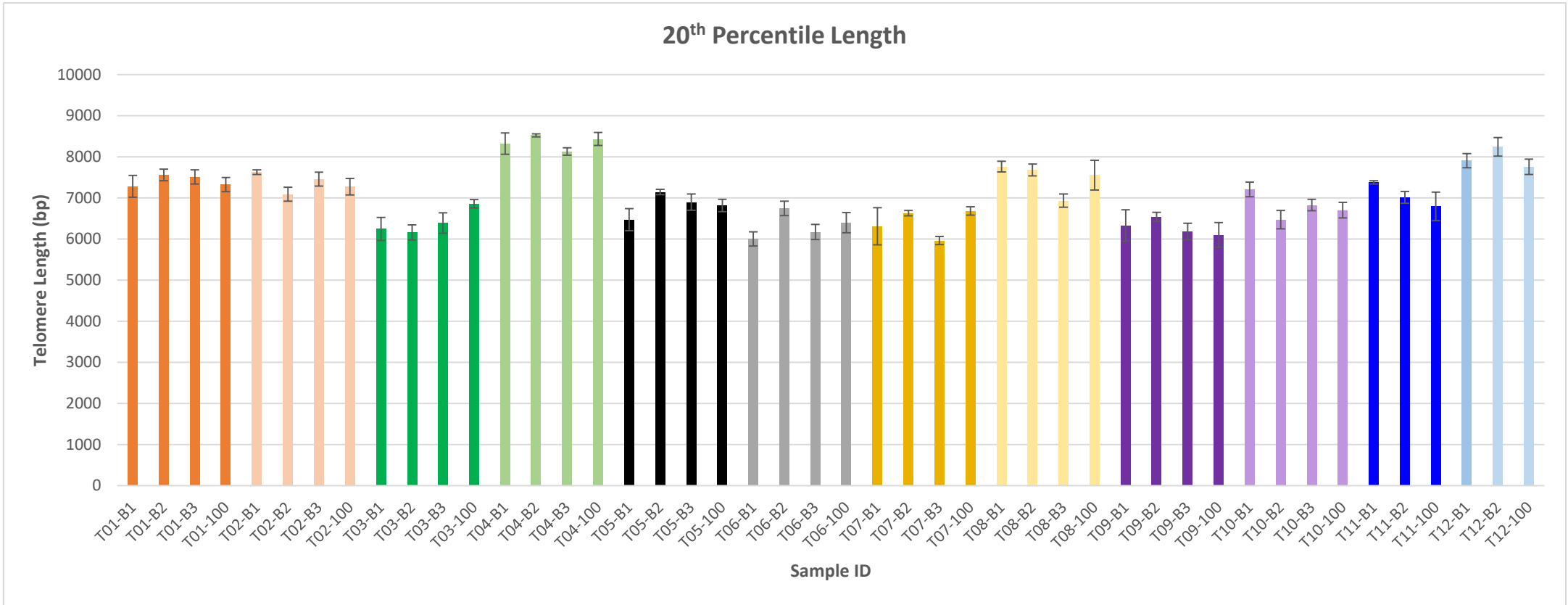
2. REFERENCES

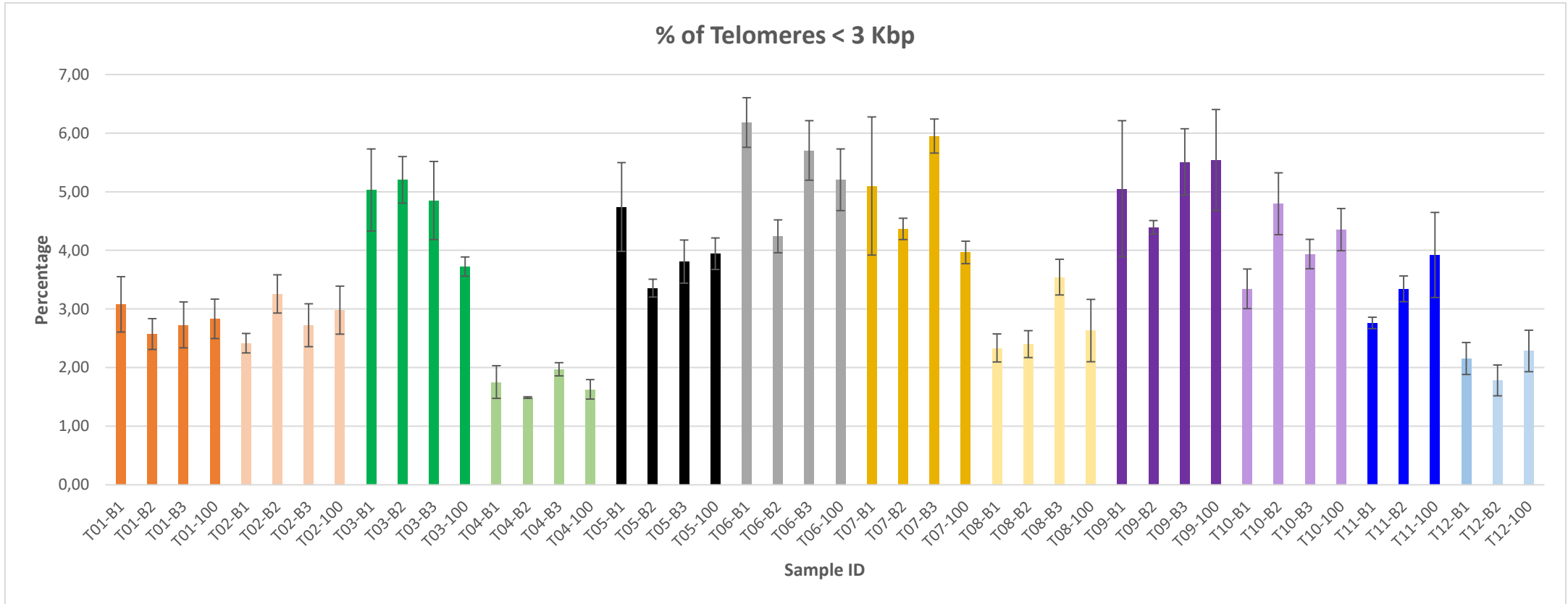
- Canela A1, Vera E, Klatt P, Blasco MA. (2007). High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. Proc Natl Acad. Sci USA. Mar 27; 104 (13):5300-5.

3. ANNEX I

Figures 1-3. Bar charts of TAT results (Median Telomere Length, 20th Percentile Telomere Length and % Short Telomeres) for all samples.









LIFE LENGTH

Life Length is the leader in telomere diagnostics with offerings at the forefront of cutting edge technology.

For any clarifications or questions regarding the study results, please do not hesitate to contact us.

Visit us at: www.lifelength.com

CONTACT INFO

Life Length

C/Miguel Angel, 11 – 2nd floor
28010 – Madrid, Spain

Tel: (+34) 91 737 1298

Fax: (+34) 91 310 1753

Email: info@lifelength.com