



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 339 172**

⑤1 Int. Cl.:
C02F 1/461 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **07250765 .0**

⑨6 Fecha de presentación : **23.02.2007**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1826183**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

⑤4 Título: **Agua ionizada y método para producirla.**

③0 Prioridad: **24.02.2006 US 776502 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2010

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2010

⑦3 Titular/es: **Skyview Enterprises**
61 W, 9th Street, 2A
New York, New York 10011, US

⑦2 Inventor/es: **Sato, Kimihiro**

⑦4 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agua ionizada y método para producirla.

5 Antecedentes de la invención**Sector técnico**

De modo general, la presente invención se refiere al sector del agua ionizada. Más específicamente, la presente
10 invención se refiere a un método de producción de agua que tiene beneficios que fomentan la salud.

Técnica antecedente

De modo general, existen dos tipos de aguas ionizadas disponibles en el mercado: agua ionizada alcalina y agua
15 ionizada ácida. Estas aguas poseen varios beneficios para el fomento de la salud. Se ha sugerido que el agua ionizada alcalina previene o revierte resfriados comunes, diabetes, osteoporosis y obesidad. El agua ionizada ácida proporciona beneficios tales como la mejora de la cicatrización de heridas, reducción del acné, alivio de las úlceras de garganta y de boca, y funciones desinfectantes.

20 Existe un tercer tipo de agua ionizada. Es el agua ionizada neutra (AIN) y presenta un interés atractivo como agente desinfectante seguro. En base al hecho de que tiene propiedades anti-bacterianas sin contener ningún compuesto químico, tales como esteroides o antibióticos, el AIN se utiliza como spray para la cicatrización de heridas para animales, y ha demostrado ser segura incluso si es ingerida o lamida por animales. El AIN tiene pH neutro y no causa irritación de la piel o los ojos. Sin embargo, se sabe poco sobre los beneficios del AIN en el fomento de la salud.

25 Para producir AIN, habitualmente se ha realizado electrolisis en presencia de NaCl. Se ha demostrado que un derivado de esta electrolisis, el ácido hipocloroso, es el componente anti-bacteriano (Rutala, W. A., y otros.). Sin embargo, el ácido hipocloroso causa estrés inflamatorio en células de mamífero debido a su fuerte propiedad oxidante (Winterbourn, C.C.).

30 Se ha documentado que las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden provocar muchos tipos de daños a biomoléculas y eventos celulares, dando como resultado, por consiguiente, el desarrollo de diversos estados patológicos tales como inflamación, cáncer y envejecimiento (Grisham, M. B., y otros. y Lavrovsky, Y., y otros.). Las formas de vida más antiguas, tales como las bacterias, han desarrollado hidrogenasas, que son enzimas que catalizan especies reactivas de oxígeno dando como resultado la producción de hidrógeno activo y neutralizando de este modo los efectos
35 dañinos del oxígeno reactivo (Ghirardi, M. L., y otros.). Sin embargo, el ser humano y otros animales evolucionados no poseen hidrogenasa. Para desactivar el oxígeno reactivo, puede suministrarse un antioxidante a partir de fuentes exógenas, tales como comida y agua.

40 En un esfuerzo por eliminar la presencia de sustancias dañinas en el agua ionizada, se han desarrollado diversos métodos de formación de agua ionizada. Uno de dichos métodos, dado a conocer en la Publicación Japonesa 7-303885, es la utilización de electrolisis de diafragma o sin diafragma para formar agua ácida en el lado de un ánodo y agua alcalina en el lado de un cátodo y la inclusión de una sal de calcio y un agente reductor soluble en agua entre las dos formas de agua para realizar la electrolisis. El método pretende crear agua que contiene iones alcalinos sin formar
45 sustancias dañinas. El proceso es engorroso y el agua resultante puede seguir incluyendo cloro o hipoclorito.

Por consiguiente, existe una necesidad de un método de producción de agua ionizada libre de hipoclorito. También sería beneficioso crear un método de producción de agua ionizada libre de hipoclorito que posea las mismas propiedades que el agua ionizada neutra.

50 Adicionalmente, el mercado del bienestar físico actualmente proporciona muchas bebidas diseñadas para fomentar beneficios para la salud. Dichas bebidas incluyen muchas vitaminas diseñadas para proporcionar al consumidor un beneficio predeterminado. Los ejemplos de dichos beneficios incluyen, aunque no constituyen limitación, relajación, más energía, y la capacidad de concentrarse mejor. Aunque dichos beneficios son útiles, no existen pruebas de que las
55 bebidas proporcionen beneficio alguno al bienestar general del individuo. Por lo tanto, sería beneficioso desarrollar un agua ionizada que no solamente pueda utilizarse como se ha dado a conocer, sino también como una bebida para fomentar la salud general para los individuos.

Características de la invención

60 Según la presente invención, se da a conocer un método de formación de agua ionizada neutra libre de hipoclorito enriquecida en hidrógeno, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

65 Otras ventajas de la presente invención se apreciarán fácilmente, ya que la misma se entiende mejor en referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considera junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un diagrama de barras que demuestra la elevada concentración de hidrógeno disuelto en el AIN de la presente invención en comparación con aguas no procesadas desionizadas de control (ADI y el 0,12% de NaCl);

La figura 2 demuestra la actividad antioxidante del AIN de la presente invención;

La figura 3A es una demostración por microscopía fluorescente de la actividad antioxidante del AIN sobre las especies reactivas de oxígeno intracelulares (ERO) inducidas por estimulación inflamatoria con mitógeno, LPS, en células precursoras de osteoclastos de ratón RAW264.7. La figura 3B representa células de control no tratadas, en las que no se indujeron ERO en las células RAW264.7;

La figura 4 contiene diagramas de barras que ilustran el efecto antiinflamatorio del AIN que contiene hipoclorito sobre la producción de citoquinas proinflamatorias por células mononucleares de la sangre periférica humanas estimuladas con mitógeno, peptidoglicano, *in vitro*, en los que “*” significa significativamente más bajo que el medio de control estimulado con peptidoglicano mediante test t de Student ($P < 0,05$);

La figura 5 es un gráfico que demuestra la falta de correlación entre la concentración de ácido hipocloroso en el AIN que contiene hipoclorito y el efecto inhibitor del AIN sobre la producción de citoquina proinflamatoria, TNF- α ;

La figura 6 es un gráfico que ilustra el efecto del AIN que contiene hipoclorito, agua desionizada no electrolizada regular que contiene hidrógeno disuelto (ADI con HD) o agua con hipoclorito sódico (NaClO) sobre la producción de IL-1 β por células mononucleares de la sangre periférica humanas estimuladas con peptidoglicano *in vitro*, en el que “*” significa significativamente más bajo que el medio de control estimulado con peptidoglicano mediante test t de Student ($P < 0,05$) y “***” significa significativamente más alto que el medio de control estimulado con peptidoglicano mediante test t de Student ($P < 0,05$);

La figura 7 incluye gráficos que ilustran la estabilidad de la actividad antiinflamatoria del AIN que contiene hipoclorito sobre la producción de citoquinas proinflamatorias por células mononucleares de la sangre periférica humanas a lo largo del tiempo (a 1,5 meses ó 3 meses) y con AIN generada utilizando diferentes concentraciones de NaCl;

La figura 8 ilustra el efecto inhibitor del AIN que contiene hipoclorito sobre la diferenciación de osteoclastos *in vitro* en presencia o ausencia de RANKL (ligando del receptor activador de NF-Kappa B) utilizando la línea celular precursora de osteoclastos de ratón RAW264.7;

La figura 9 muestra el efecto inhibitor del AIN que contiene hipoclorito sobre la diferenciación de osteoclastos *in vitro* utilizando células RAW264.7 a diferentes concentraciones de RANKL, en la que “*” significa significativamente más bajo que el medio de ADI de control que contiene una cantidad correspondiente de RANKL, mediante test t de Student ($P < 0,01$);

La figura 10 demuestra el efecto inhibitor del AIN que contiene hipoclorito sobre la inducción de osteoclastos *in vivo* mediada por RANKL/LPS en tejido de la bóveda craneal de ratón, en la que “*” significa significativamente elevado en comparación con el grupo A de control negativo mediante test t de Student ($P < 0,05$) y “***” significa significativamente más bajo que el grupo B mediante test t de Student ($P < 0,05$);

La figura 11 incluye demostraciones histológicas de osteoclastos positivos para fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) inducidos en tejido de la bóveda craneal de ratón, en la que la figura 11A es el tejido de la bóveda craneal de un ratón al que se le ha inyectado RANKL/LPS y mantenido con ADI como agua para beber *Ad libitum* y la figura 11B es tejido de la bóveda craneal de un ratón al que se le ha inyectado RANKL/LPS y mantenido con AIN que contiene hipoclorito como agua para beber *Ad libitum* [x 200];

La figura 12 es un diagrama de barras que muestra el efecto inhibitor del AIN que contiene hipoclorito sobre la IL-1 β producida en el suero de ratones inyectados con RANKL/LPS;

La figura 13 demuestra el efecto inhibitor del AIN que contiene hipoclorito sobre la pérdida de hueso periodontal dependiente de RANKL/LPS *in vivo* utilizando un modelo de rata;

La figura 14 demuestra la inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vitro* por AIN que contiene hipoclorito utilizando dos tipos de líneas celulares cancerosas, MDA-MB-435S (carcinoma ductal de mama humano) y Jurkat E6-1 (leucemia de células T aguda humana), en la que “*” significa significativamente más bajo que el medio de control a la proporción de dilución correspondiente, mediante test t de Student ($P < 0,05$);

La figura 15 es un gráfico que muestra la concentración de hipoclorito producida en una solución de NaCl después de diferentes periodos de tiempo de electrolisis utilizando la máquina de la presente invención;

La figura 16 es un gráfico que muestra la producción de TNF- α por células RAW264.7 en agua ionizada (AI) electrolizada en presencia de NaCl en diferentes periodos de tiempo utilizando la máquina de la presente invención (figuras 18-22);

ES 2 339 172 T3

La figura 17 es un gráfico que muestra el AI electrolizada en presencia de CaCl_2 , utilizando la máquina de la presente invención, que posee hipoclorito, en la que la solución de lactato de Ca en AI, que también se generó utilizando la máquina de la presente invención, no produce hipoclorito;

5 La figura 18 es un gráfico que muestra los efectos antiinflamatorios de la solución de lactato de Ca electrolizada sobre la producción de $\text{TNF-}\alpha$ por células RAW264.7 estimuladas con LPS; y

La figura 19 es una fotografía de un agitador magnético remoto para su utilización en la máquina de la presente invención;

10 La figura 20 es una fotografía de un agitador magnético remoto para su utilización en la máquina de la presente invención;

La figura 21 es una fotografía de un agitador magnético remoto para su utilización en la máquina de la presente invención;

La figura 22 es una fotografía de un agitador magnético remoto para su utilización en la máquina de la presente invención;

20 La figura 23 es un gráfico que muestra los efectos del AIN que contiene hipoclorito sobre la pérdida de peso corporal en ratones con colitis inducida por DDS;

Las figuras 24A y 24B son gráficos que muestran los efectos antiinflamatorios de una solución de lactato de Ca electrolizada utilizando la máquina de la presente invención sobre la producción de $\text{TNF-}\alpha$ por células estimuladas con LPS a concentraciones variables de lactato de Ca, la figura 24A muestra el 0,05% de lactato de Ca y la figura 24B muestra el 1% de lactato de Ca;

30 Las figuras 25A y 25B son gráficos que muestran los efectos del AIN generada utilizando la máquina de la presente invención en presencia de NaCl o NaHCO_3 , respectivamente, sobre la hepatitis aguda de ratón inducida por Concanavalina-A;

La figura 26 es un gráfico que muestra los efectos del AIN electrolizada que contiene hipoclorito sobre la producción de óxido nítrico por células RAW264.7 estimuladas con LPS;

35 La figura 27 es un gráfico que muestra los efectos del AIN electrolizada que contiene hipoclorito sobre la diferenciación de osteoclastos por células RAW264.7 estimuladas con RANKL;

La figura 28 es un gráfico que muestra la producción de hidrógeno en agua durante el proceso de electrolisis utilizando la máquina de la presente invención, en el que se disuelve NaCl o NaHCO_3 en agua desionizada;

40 La figura 29 es un gráfico que muestra los efectos antiinflamatorios del agua ionizada que se generó mediante electrolisis del agua en presencia del 0,05% de NaHCO_3 que no contiene hipoclorito;

La figura 30 es un gráfico que muestra el AIN libre de hipoclorito a partir de solución de NaHCO_3 utilizando la máquina de la presente invención;

La figura 31 es un gráfico que muestra el pH neutro estable en el agua electrolizada utilizando la máquina de la presente invención;

50 La figura 32 es un gráfico que muestra los efectos de la temperatura durante el proceso de electrolisis para generar AIN a partir de una solución de NaCl utilizando la máquina de la presente invención; y

La figura 33 es un gráfico que muestra los efectos de la temperatura durante el proceso de electrolisis para generar AIN a partir de una solución de NaHCO_3 utilizando la máquina de la presente invención.

55

Descripción detallada de la invención

60 La presente invención se refiere a un método de formación de agua ionizada neutra libre de hipoclorito enriquecida en hidrógeno, como se define en las reivindicaciones adjuntas. El agua ionizada tiene numerosos beneficios que fomentan la salud y, por lo tanto, puede utilizarse para fomentar, de modo general, la salud del usuario o el agua ionizada puede utilizarse para la prevención y el tratamiento de enfermedades y afecciones tales como las que se mencionan en el presente documento.

65 La expresión “agua ionizada”, tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir agua ionizada que incluye lactato cálcico, bicarbonato sódico, u otros compuestos que no generan hipoclorito. El agua ionizada se produce utilizando la metodología que se da a conocer en el presente documento y puede utilizarse en el tratamiento de enfermedades y afecciones. Por ejemplo, el agua se procesa como se describe en el presente documento, de modo que

muestra uno o más de los siguientes efectos biológicos: la inhibición de la producción de citoquina proinflamatoria, la inhibición de la resorción ósea, y la inhibición del crecimiento de células cancerosas.

La expresión “pH neutro”, tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir un pH en un intervalo de 5-9, como es conocido por los expertos en la materia.

La expresión “lactato cálcico”, tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir, aunque no constituye limitación, una sal cristalina blanca preparada mediante la acción de ácido láctico sobre calcio, que tiene la fórmula molecular $(\text{CH}_3\text{CHOHCOO})_2\text{Ca}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

La expresión “bicarbonato sódico” (es decir, bicarbonato de sosa), tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir, aunque no constituye limitación, una sal cristalina blanca preparada mediante la acción de carbonato sobre sodio, que tiene la fórmula molecular NaHCO_3 .

La expresión “máquina de electrolisis”, tal como se utiliza en el presente documento, pretende incluir, aunque no constituye limitación, una máquina estándar capaz de realizar la electrolisis que se da a conocer en el presente documento. Preferentemente, la máquina es una máquina de electroforesis en gel tales como Buffer Puffer™ Horizontal System (figura 21, máquina de la parte superior en la foto, Buffer Puffer™ B3, tamaño de 1 litro; máquina de la parte inferior en la foto, Buffer Puffer™ A5, tamaño de 2,5 litros), que es producida por Owl Separation Systems (figura 19). Como se muestra en la figura 20, el baño de electroforesis auto-recirculante Buffer Puffer™ de Owl Separation Systems es una manera de recircular el agua de electrolisis en un aparato para prevenir la formación de gradientes de pH o iónicos. El agua de un extremo del baño de electrolisis viaja a través de un tubo de conexión hasta el otro extremo, permitiendo que el agua de electrolisis recircule sin necesidad de bombas, tuberías, u otros accesorios engorrosos. Se utilizan burbujas, en las cuales el elemento principal es hidrógeno, para proporcionar en el extremo cercano al electrodo positivo la fuerza para empujar al agua de vuelta al otro extremo del baño de electrolisis. El proceso de disolución de hidrógeno en el agua se promueve durante el desplazamiento de burbujas que contienen hidrógeno a través del tubo de conexión. Las instrucciones que se proporcionan con el sistema pueden utilizarse junto con la metodología que se describe posteriormente.

El AI de la presente invención puede prepararse mediante electrolisis en una celda electrolítica de diafragma o sin diafragma que está equipada con múltiples electrodos, puede utilizarse un agitador oscilante, un tubo de conexión auto-recirculante o un agitador remoto. El agitador remoto equipado en el baño de electroforesis auto-recirculante Buffer Puffer™ ofrece la generación de la recirculación de agua suficientemente eficaz durante el proceso de electrolisis para prevenir la formación de gradientes de pH o iónicos (figura 20). La relevancia de la agitación en la generación de agua ionizada neutra se muestra en la figura 20. Utilizando el sistema Buffer Puffer A5, la electrolisis de una solución del 0,01% de NaCl (corriente constante de 30 mA, temperatura ambiente) durante más de dos horas, da como resultado el incremento de pH de 6,94 a 11,16. Sin embargo, dado que el agua era agitada por un agitador magnético durante la electrolisis de la solución del 0,1% de NaCl (corriente constante de 30 mA, temperatura ambiente), el pH del agua permanecía estable (hora 0, pH 6,94; hora 8, pH 7,01). Preferentemente, el agitador es un agitador magnético. El agitador magnético remoto puede ser cualquier dispositivo de agitación magnético conocido por los expertos en la materia. El agitador puede no colocarse dentro de la máquina, sino por debajo de ésta. El beneficio de dicho emplazamiento es que el agitador sigue siendo capaz de agitar el agua sin contaminar el agua. Por ejemplo, una barra de agitación recubierta de Teflón® blanco, un homopolímero de tetrafluoroetileno comercializado por DuPont, como se muestra en las figuras 22-A, 22-B y 22-C, se coloca en una posición por debajo de la máquina. Esta configuración elimina la posible contaminación del agua. El agua ionizada neutra se produce disolviendo una pequeña cantidad de, como mínimo, un tipo de sal, por ejemplo, CaCl_2 , NaCl, lactato de Ca, o NaHCO_3 a una concentración que varía entre el 0,05-0,2%, en agua corriente, agua destilada, agua blanda, agua desionizada y agua de OI (membrana de ósmosis inversa). Especialmente, la sal que no contiene Cl (Cloro), tal como lactato de Ca o NaHCO_3 , puede generar agua ionizada neutra sin hipoclorito derivado tóxico. La electrolisis se realiza por medio de una corriente continua o corriente pulsada, mientras se mantiene el voltaje en un intervalo de 1 a 30 V, y manteniendo la densidad de corriente en un intervalo de 5 a 300 A/dm². El agua se somete a electrolisis a bajas temperaturas del agua, en un intervalo entre 4-9°C. También puede inyectarse hidrógeno en el agua para prolongar la vida útil del agua.

El agua ionizada que se da a conocer en el presente documento puede utilizarse para prevenir y tratar enfermedades y afecciones, como se da a conocer en el presente documento. Además, el agua ionizada puede tener efectos antiinflamatorios, antibacterianos, y otros efectos terapéuticos después de la administración a un paciente. Por ejemplo, el agua ionizada puede inhibir a la óxido nítrico sintasa inducible y las fosfatasa ácidas resistentes a tartrato que están implicadas en la inflamación y en la resorción ósea.

En la presente invención se muestran las propiedades químicas y biológicas de dos tipos diferentes de AIN; 1) AIN que contiene hipoclorito que se genera a partir de una solución que contiene NaCl (figuras 1-16, 23, 25B, 26, 27 y 30) y 2) AIN sin hipoclorito que se genera a partir de lactato cálcico o bicarbonato sódico (figuras, 17, 18, 24, 25A, 29). Las propiedades biológicas del AIN de la presente invención se atribuyen al hidrógeno acumulado en el AIN durante el proceso de electrolisis (figura 1: AIN que contiene hipoclorito y figura 28: AIN sin hipoclorito). Por lo tanto, ya contenga o no hipoclorito, el resultado es el mismo: ambas AIN provocan actividades antiinflamatorias en base al elemento común presente en el agua, es decir hidrógeno, uno de los antioxidantes más potentes.

Como se muestra en la figura 1, el AIN contiene más de tres veces de hidrógeno disuelto en comparación con agua desionizada de control (ADI). Más específicamente, el agua desionizada regular contenía 0,5 ppm o menos de hidrógeno disuelto, mientras que el AIN contenía 1,5 ppm. Además, esta elevada concentración de hidrógeno disuelto se conserva en el AIN, como mínimo, dos meses después de que se genera el AIN utilizando una máquina de electrolisis desarrollada por Tokyo Techno (Tokio, Japón).

Además, el AIN posee actividad antioxidante, como se demuestra en las figuras 2 y 3. Más específicamente, el AIN generada a partir de una solución de NaCl mostraba actividad antioxidante comparable a un antioxidante de control, 2-ME, en comparación con aguas desionizadas no procesadas de control. Este efecto se observó además en el análisis de microscopía fluorescente de células RAW264.7 (precursoras de osteoclastos de ratón), en las que el AIN anulaba la inducción de ERO dependiente de LPS (véase el ejemplo 2 más adelante).

El AIN tiene muchas realizaciones. Según una realización, el tratamiento y/o la prevención de la inflamación. Más específicamente, la utilización de AIN inhibió la producción de citoquinas proinflamatorias incluyendo IL-1 β , TNF- α e IL-12 (p40) por células mononucleares de la sangre periférica humanas *in vitro* en respuesta a la estimulación mitogénica con peptidoglicano (figuras 4 y 6). Además, el AIN mostró actividad antiinflamatoria *in vivo* (figura 12). También se demostraron resultados similares cuando se utilizó LPS como mitógeno.

El AIN de la presente invención inhibe la diferenciación de osteoclastos mediada por RANKL/LPS *in vitro* e *in vivo* (figuras 8-11). Más específicamente, el AIN generado a partir de una solución de NaCl regulaba negativamente de forma significativa la resorción ósea inducida por la inyección de RANKL/LPS en los tejidos de la bóveda craneal de ratón (figura 13).

El AIN generada a partir de una solución de NaCl suprime el crecimiento de dos tipos de líneas celulares cancerosas humanas: MDA-MB-435S (carcinoma ductal de mama humano) y Jurkat E6-1 (leucemia de células T aguda humana) (figura 14).

Por lo tanto, el AIN es útil en el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos, incluyendo cáncer, osteoporosis, artritis reumatoide y enfermedad periodontal. Además, el AIN tiene diversas aplicaciones cosméticas y nutraceuticas, por ejemplo, en el tratamiento de psoriasis, acné y úlceras bucales (úlceras aftosas secundarias recurrentes).

En la utilización, el agua ionizada se administra y se dosifica según las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el punto y el método de administración, el calendario de administración, la edad, el sexo el peso corporal del paciente y otros factores conocidos por los facultativos médicos. La "cantidad farmacéuticamente eficaz" para los fines del presente documento se determina, por lo tanto, mediante consideraciones tales como se conocen en la técnica. La cantidad debe ser eficaz para conseguir una mejora incluyendo, sin constituir limitación, la tasa de supervivencia mejorada o recuperación más rápida, o mejoría o eliminación de los síntomas y otros indicadores que son seleccionados como mediciones apropiadas por los expertos en la materia.

El agua ionizada de la presente invención puede administrarse de diversas maneras. Debe observarse que puede administrarse como agua sola o como un ingrediente activo en combinación con portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables. El AI se administra preferentemente por vía oral, pero también puede administrarse de otras maneras aceptables tales como por vía subcutánea o por vía parenteral incluyendo administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, por vía intraperitoneal, e intranasal así como intratecal y técnicas de infusión. También son útiles los implantes de los compuestos. El paciente que está siendo tratado es un animal de sangre caliente y, en particular, mamíferos incluyendo el ser humano. Los portadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables así como portadores de implante se refieren de modo general a cargas, diluyentes o material encapsulante inerte, sólido o líquido no tóxico, que no reaccionan con los ingredientes activos.

Se observa que los seres humanos son tratados, de modo general, durante más tiempo que los ratones u otros animales experimentales ejemplificados en el presente documento, tratamiento que tiene una duración proporcional a la duración del proceso de la enfermedad y a la eficacia del fármaco. Las dosis pueden ser dosis únicas o dosis múltiples durante un periodo de varios días, pero se prefieren dosis únicas. El tratamiento tiene generalmente una duración proporcional a la duración del proceso de la enfermedad y la eficacia del fármaco y la especie del paciente que está siendo tratado.

Cuando se administra el AI de la presente invención por vía parenteral, ésta puede administrarse como una bebida (por ejemplo, refresco u otra formulación) o puede formularse en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión o emulsión). Además, el AI de la presente invención puede administrarse en aplicaciones tópicas. Por ejemplo, el AI de la presente invención puede aplicarse directamente a la piel, o incorporarse en diversos cosméticos, polvos, pomadas, cremas, aceites, lociones, y similares. Adicionalmente, el AI de la presente invención puede añadirse a nutraceuticos u otros suplementos alimenticios. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante la utilización de surfactantes. También pueden utilizarse vehículos no acuosos tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol, o aceite de cacahuete y ésteres, tales como miristato de isopropilo, como sistemas disolventes para composiciones de compuestos. Adicionalmente, pueden añadirse diversos aditivos, que mejoran la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluyendo conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y tampones. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. En muchos casos, será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro sódico, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la utilización de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Cualquier vehículo, diluyente, o aditivo utilizado tendría que ser compatible con los compuestos.

Puede administrarse una formulación farmacológica al paciente en una formulación inyectable que contiene cualquier portador compatible, tal como diversos vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes; o los compuestos utilizados en la presente invención pueden administrarse por vía parenteral al paciente en forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o sistemas de administración dirigida tales como anticuerpos monoclonales, administración mediante vectores, iontoforética, matrices poliméricas, liposomas y microesferas. Los ejemplos de sistemas de administración incluyen los documentos: 5.225.182; 5.169.383; 5.167.616; 4.959.217; 4.925.678; 4.487.603; 4.486.194; 4.447.233; 4.447.224; 4.439.196; y 4.475.196. Muchos otros de dichos implantes, sistemas de administración y módulos son bien conocidos por los expertos en la materia.

El agua ionizada de la presente invención puede administrarse inicialmente mediante inyección intravenosa para llevar los niveles en sangre a un nivel adecuado. Los niveles del paciente se mantienen a continuación mediante una forma de dosificación oral, aunque pueden utilizarse otras formas de administración, dependientes del estado del paciente y como se ha indicado anteriormente.

La presente invención se describe con más detalle en referencia a los siguientes ejemplos experimentales. Estos ejemplos se dan a conocer solamente para fines de ilustración, y no pretenden ser limitantes, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

Materiales y métodos

Medio de cultivo

Para el cultivo de células mononucleares de la sangre periférica humanas, líneas celulares cancerosas humanas y la línea celular RAW264.7 de ratón, se prepararon medios de cultivo disolviendo la fórmula de polvo de α -MEM (Sigma) en solución del 0,1% de NaCl de control en agua desionizada (ADI, generada a partir de agua corriente utilizando el sistema Barnstead Nanopure Infinity) o AIN. El AIN se generó mediante la electrolisis de una solución del 0,1% de NaCl en ADI utilizando una máquina de procesamiento de AIN fabricada por Tokyo Techno (Tokio, Japón). El AIN también se generó mediante electrolisis del 0,05%-0,2% de CaCl_2 , NaCl, lactato de Ca, o NaCHO_3 en ADI utilizando la máquina. El medio disuelto se esterilizó pasando a través de un filtro de 0,2 μm de tamaño de poro y se suplementó con el 10% de FBS (suero fetal bovino), penicilina (100 U), estreptomina (100 $\mu\text{g/ml}$), L-glutamina (2 mM) y HEPES (0,01 M). El medio suplementado con el 10% de FBS más penicilina/estreptomina, L-glutamina y HEPES se denomina en el presente documento como "medio completo".

Medición de la concentración de ácido hipocloroso en agua

Se utilizó el kit de ensayo de cloro DPD (Sugiken inc. Tokio Japón) para medir la concentración de ácido hipocloroso (o hipoclorito) después de la modificación del protocolo proporcionado por el fabricante.

Se utilizó el kit de generación de HD a base de magnesio natural (Kasseisuisokun, Water Institute Inc., Tokio, Japón). Utilizando este kit, se generó HD (0,4-1,5 ppm) en ADI.

Ejemplo uno para fines de antecedentes

El AIN tiene una mayor concentración de hidrógeno disuelto que las aguas no procesadas

Se aplicó AIN generada a partir de una solución de NaCl, agua desionizada no procesada de control (ADI) o ADI que contenía el 0,12% de NaCl en tubos de vidrio lavados exhaustivamente y secados al aire (8,5 ml/tubo, tubo Vacutainer, Becton Dickinson) a una atmósfera convencional y sellados herméticamente con un tapón de goma. Después de 2 días, se midió la concentración de hidrógeno en el espacio libre superior (4,5 ml) de cada tubo mediante un analizador de gases reductores Kappa-3 RGA-3/E001 (Trace Analytical). El aire del espacio libre superior de los tubos que contenían AIN, ADI o ADI que contenía el 0,12% de NaCl mostraba que la concentración de hidrógeno del AIN era de 1,55 ppm en comparación con las concentraciones de los controles de ADI, que eran de 0,48 ppm y 0,36 ppm, respectivamente (véase la figura 1).

Ejemplo dos para fines de antecedentes

El efecto antioxidante de AIN generada a partir de una solución de NaCl

5 Se diluyeron de forma sucesiva diversas muestras de agua en agua desionizada no procesada de control (ADI), de modo que todas las diluciones de muestra incluían el 0,005% de H_2O_2 . El AIN se generó mediante electrolisis durante 210 minutos en presencia del 0,12% de NaCl, y contenía 85 ppm de NaClO. Una muestra de AIN (10 ml) se trató adicionalmente con exposición a microondas (a 1000 W durante 30 segundos). Se disolvió NaClO a 85 ppm o 2-mercaptoetanol a 100 ppm (2-ME, reductor/antioxidante) en ADI que contenía el 0,12% de NaCl. Todas las muestras
10 de agua diluidas (200 l/pocillo en placas de ELISA de 96 pocillos) se incubaron a 37°C durante 12 horas. Después de la incubación, se mezclaron 25 μ l de tampón citrato 10x que contenía diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD, 20 mg/ml) y peroxidasa de rábano rusticano (dilución 300 de anticuerpo conjugado a peroxidasa de rábano rusticano, Sigma A-8919) con las muestras. El desarrollo de color del OPD, como resultado de la actividad de peroxidasa, era dependiente de la concentración de H_2O_2 en las muestras. El desarrollo de color se interrumpió después de 10 minutos
15 de incubación añadiendo H_2SO_4 2 N (50 μ l/pocillo). Como se demuestra en la figura 2, el AIN redujo la concentración de H_2O_2 en las muestras de una manera similar al control antioxidante, 2-ME.

Además, el AIN demostró un efecto antioxidante sobre las ERO intracelulares inducidas por estimulación inflamatoria. Más específicamente, se incubaron células RAW264.7 en 10% de FBS que contenía α -MEM disuelto en a) 0,12% de NaCl, b) 0,12% de NaCl + 85 ppm de NaClO, o c) AIN. Las células se incubaron en presencia o ausencia
20 de LPS de *E. coli* (1 μ g/ml) durante 24 horas. Las células se tiñeron con un agente que reacciona con ERO derivado de fluoresceína, diacetato de 5-(y 6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (# C400, Molecular Probes). El C400 solamente reacciona con ERO y desarrolla emisión de fluorescencia a un intervalo de longitud de onda de 517-527 nm. El patrón de tinción se analizó mediante la formación secuencia de secciones ópticas de 0,3 μ m a aumentos de x400 o x1000 con un microscopio confocal de barrido por láser Leica™ TCS/SP-2.
25

Como se indica en la figura 3A, el tratamiento con LPS indujo ERO intracelulares por las células RAW264.7 cultivadas en a) el 0,12% de NaCl y b) el 0,12% de NaCl + 85 ppm de NaClO. Por el contrario, las células RAW264.7 incubadas en medio a base de NIW anulaban la inducción de ERO dependiente de LPS. Las ERO teñidas con C400
30 mostraban un color verde. Sin embargo, las células RAW264.7 cultivadas en ausencia de LPS no mostraban ERO intracelulares, independientemente de que el medio de cultivo contenga a) el 0,12% de NaCl, b) el 0,12% de NaCl + 85 ppm de NaClO o c) AIN. Estos resultados demostraron que el AIN puede inhibir la inducción de ERO mediante estimulación por LPS, mientras que el propio AIN no inducía la inducción de ERO.

35 Ejemplo tres para fines de antecedentes

Efecto inhibidor de AIN generado a partir de una solución de NaCl sobre la producción de citoquinas proinflamatorias por monocitos de la sangre periférica humanos in vitro

40 Se recogió sangre periférica humana muestreada de voluntarios sanos en tubos de recogida heparinizados (Vacutainer, Becton Dickinson). Se obtuvo el consentimiento informado de cada sujeto antes de la inclusión en este estudio. Después de lavar la sangre recogida con PBS (solución salina tamponada con fosfato), se aislaron células mononucleares mediante una centrifuga en gradiente utilizando Histopaque™ (Sigma). Las células mononucleares (2×10^5 células/200 μ l/pocillo) se cultivaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con medio α -MEM completo disuelto
45 en AIN generada a partir de una solución del 0,12% de NaCl o ADI en presencia o ausencia de agentes mitogénicos, peptidoglicano (PG) o lipopolisacárido (LPS). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron después de la incubación de las células mononucleares durante 24-48 horas en una incubadora de CO_2 a 37°C.

Más específicamente, se estimularon células mononucleares de la sangre periférica humanas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con 5 μ g/ml de peptidoglicano (PG: origen de *Staphylococcus aureus*, de Sigma) en medio completo de α -MEM a base de AIN (25% de AIN, 75% de ADI) o completo de α -MEM a base de ADI (100% de ADI). Se ensayaron dos tipos de AIN generados mediante diferentes condiciones de electrolisis (AIN-A, electrolisis a 7,0 Amperios, voltaje de 12,1 durante 120 minutos o AIN-B, electrolisis a 11,0 Amperios, voltaje de 12,1, 90 minutos). Después de 24 horas de incubación, se recogieron los sobrenadantes de cultivo de las placas de 96 pocillos
55 y se diluyeron en un volumen igual de PBS que contenía el 0,05% de detergente Tween 20 (PBST). Se emplearon kits de ELISA disponibles en el mercado para IL-1 β , TNF- α e IL-12 (p40) para medir la concentración de cada citoquina proinflamatoria en los sobrenadantes de cultivo.

Como se indica en la figura 4, el AIN inhibió la producción de citoquinas proinflamatorias incluyendo IL-1 β , TNF- α e IL-12 (p40) por células mononucleares de la sangre periférica humanas en respuesta a la estimulación mitogénica con peptidoglicano. Se demostraron resultados similares cuando se utilizó LPS como mitógeno.

Además, existió falta de correlación entre la concentración de ácido hipocloroso en el AIN y los efectos inhibidores de AIN sobre la inducción de citoquinas proinflamatorias. Dado que se considera que el ácido hipocloroso es un
65 componente activo fundamental en el AIN, se realizó un examen para evaluar la relación entre la concentración de ácido hipocloroso en el AIN y el efecto inhibidor del AIN sobre la producción de TNF- α mediada por peptidoglicano por la línea celular precursora de osteoclastos de ratón, RAW264.7.

Más específicamente, las células RAW264.7 (en placas de cultivo tisular de 96 pocillos) se estimularon con 5 $\mu\text{g/ml}$ de peptidoglicano (origen de *Staphylococcus aureus*, de Sigma) en α -MEM a base de AIN (25% de AIN, 75% de ADI) suplementado con el 10% de FBS. Se compararon AIN que contenían quince diferentes concentraciones de ácido hipocloroso con respecto a su efecto sobre la producción de TNF- α por las células RAW264.7. Después de la incubación durante 24 horas, se recogieron sobrenadantes de cultivo y se diluyeron en volúmenes iguales de PBS que contenía el 0,05% de detergente Tween 20 (PBST). Se empleó un kit de ELISA disponible en el mercado para TNF- α .

Como se indica en la figura 5, no existió correlación entre el efecto inhibitor del AIN sobre la producción de TNF- α y la concentración de ácido hipocloroso en el AIN. El coeficiente de correlación, $R = 0,639$ ($N=15$), entre los dos parámetros, indica que no existe relación entre la concentración de hipoclorito en el AIN y sus efectos antiinflamatorios.

A continuación, se estudiaron los efectos de AIN generada a partir de una solución del 0,12% de NaCl o agua que contenía HD (hidrógeno disuelto) sobre la producción de citoquina proinflamatoria, IL-1 β , por las células RAW264.7 *in vitro*. En resumen, se estimularon células RAW264.7 de ratón en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con 5 $\mu\text{g/ml}$ de peptidoglicano (origen de *Staphylococcus aureus*, de Sigma) en medio completo de α -MEM a base de AIN (25% de AIN, 75% de ADI) o α -MEM a base de ADI (100% de ADI). El hidrógeno se disolvió en ADI durante dos días (ADI con HD) o se añadió adicionalmente NaClO (100 ppm) al ADI. Todos los medios utilizados en este ensayo se suplementaron con FBS (10%). Después de 24 horas de incubación, se recogieron sobrenadantes de cultivo de las placas de 96 pocillos y se diluyeron en un volumen igual de PBS que contenía el 0,05% de detergente Tween 20 (PBST). Se empleó un kit de ELISA disponible en el mercado para IL-1 β para medir la concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo.

Como se indica en la figura 6, el AIN inhibió la producción de citoquina proinflamatoria, IL-1 β , por la línea celular de monocitos de ratón RAW264.7 en respuesta a la estimulación mitogénica con peptidoglicano. Se demostraron resultados similares cuando se utilizó LPS como mitógeno. El agua con HD también inhibía la inducción de IL-1 β por las células RAW264.7, mientras que el agua con hipoclorito sódico (NaClO) aumentaba la actividad mitogénica del peptidoglicano. Los resultados de las figuras 5 y 6 indican que el hidrógeno disuelto en el AIN es el componente activo que provoca los efectos antiinflamatorios sobre células cultivadas.

Ejemplo cuatro para fines de antecedentes

La estabilidad del efecto antiinflamatorio de AIN generada a partir de una solución de NaCl

En general, el hidrógeno disuelto en agua ionizada alcalina tiene una vida muy corta. Para examinar la estabilidad de los efectos antiinflamatorios del AIN, se ensayaron dieciséis lotes diferentes de AIN para medir sus efectos a la hora de inhibir la producción de TNF- α por células RAW264.7 estimuladas con peptidoglicano, después de diferentes periodos de almacenamiento a 4°C (1,5 meses frente a 3 meses). Más específicamente, se almacenaron dieciséis lotes de AIN que contenía diferentes concentraciones de NaCl durante un mes y medio o durante tres meses a 4°C. A continuación, se estimularon células RAW264.7 de ratón en placas de cultivo tisular de 96 pocillos con 5 $\mu\text{g/ml}$ de peptidoglicano (origen de *Staphylococcus aureus*, de Sigma) en medio de α -MEM a base de AIN (25% de AIN, 75% de ADI) utilizando estos lotes de AIN almacenados. De este modo, cada medio se creaba de nuevo a partir de AIN almacenada un mes y medio o tres meses. Todos los medios utilizados en este ensayo se suplementaron con FBS (10%). Después de 24 horas de incubación, se recogieron sobrenadantes de cultivo de las placas de 96 pocillos y se diluyeron en un volumen igual de PBS que contenía el 0,05% de detergente Tween 20 (PBST). Se empleó un kit de ELISA disponible en el mercado para TNF- α para medir la concentración de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo.

Como se muestra en la figura 7, 11 lotes de AIN mantuvieron sus efectos antiinflamatorios después de un mes y medio de almacenamiento. Después de tres meses de almacenamiento, 4 lotes de AIN mantuvieron los efectos antiinflamatorios. Los lotes más estables se encontraron en AIN generada en presencia del 0,15% de NaCl.

Ejemplo cinco para fines de antecedentes

*Análisis *in vitro* del efecto inhibitor de AIN generada a partir de una solución de NaCl sobre la diferenciación de osteoclastos*

Para analizar el efecto del AIN sobre la diferenciación de osteoclastos, se estimularon células de la línea celular precursora de osteoclastos RAW264.7 con el factor de diferenciación de osteoclastos, RANKL (ligando del receptor activador de NF-Kappa B) en medio completo de α -MEM a base de ADI de control o medio completo de α -MEM a base de AIN, durante 6 días. Más específicamente, las células RAW264.7 en placas de cultivo tisular de 96 pocillos se incubaron en presencia o ausencia de RANKL recombinante (Peprotech, 50 ng/ml). En este estudio, la fórmula en polvo de medio de cultivo (α -MEM) se disolvió en ADI de control o AIN generada a partir de una solución del 0,12% de NaCl y suplementada con FBS, antibióticos y L-glutamina, como se muestra en el apartado de Materiales y Métodos descrito anteriormente. Después de la incubación durante 6 días, las células RAW264.7 se fijaron con formalina y se tiñeron para detectar fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) según el método publicado anteriormente (Kawai, T. y otros. y Valverde, P., y otros.). Las células positivas para TRAP con tres o más núcleos se contaron como células de osteoclastos maduras.

Como se muestra en la figura 8, las células multinucleares positivas para TRAP que representaban osteoclastos maduros se observaron en las células RAW264.7 que habían sido estimuladas con RANKL en el medio de ADI de control (figura 8B, células grandes y redondas con múltiples núcleos, indicadas mediante flechas), pero no en el medio de AIN (figura 8C).

Además, las células RAW264.7 se cultivaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en presencia o ausencia de RANKL a diversas concentraciones diferentes, es decir, 10, 30 ó 100 ng/ml. Se compararon α -MEM completo a base de ADI de control o a base de AIN, como su efecto sobre la osteoclastogénesis mediada por RANKL. Después de la incubación durante seis días, las células RAW264.7 se fijaron y se tiñeron para detectar TRAP como se ha descrito anteriormente. Las células positivas para TRAP con más de tres núcleos en un pocillo se contaron al microscopio. El número de células multinucleares positivas para TRAP de cada grupo se muestra en la figura 9. Como se demuestra mediante esa figura, la diferenciación de osteoclastos maduros dependiente de RANKL estaba regulada negativamente de forma significativa por el medio a base de AIN.

Ejemplo seis para fines de antecedentes

Evaluación in vivo del efecto inhibitor de AIN generada a partir de una solución del 0,12% de NaCl sobre la diferenciación de osteoclastos, utilizando el modelo de tejido de la bóveda craneal de ratón

Para evaluar los efectos del AIN sobre la diferenciación de osteoclastos inducida *in vivo* por el factor de inducción de osteoclastos RANKL y LPS, se utilizó un modelo de tejido de la bóveda craneal de ratón (Li, L. y otros.). En este estudio, ratones de la cepa C57/BL6 (machos, 6 semanas de edad) recibieron una inyección de una mezcla de LPS (100 μ g/ml) y RANKL (10 μ g/ml) disuelta en solución salina. La mezcla se inyectó en el periostio de la frente de los ratones (50 μ l/animal), que estaban bajo anestesia con ketamina y xilazina. A partir del Día 0, cuando la mezcla de LPS y RANKL se inyectó a los ratones, se administró AIN al grupo experimental *ad libitum*, mientras que los grupos de control de ratones se mantuvieron con ADI regular. Más específicamente, a tres grupos de los ratones (3 animales/grupo) se les proporcionó ADI (véase la figura 10A o B) o AIN (figura 10C) *ad libitum* durante el total del periodo de experimento de 10 días. El Día 0, se inyectó una mezcla de RANKL y LPS en el periostio de la frente de los grupos B y C, mientras que el grupo de control negativo A no recibió ninguna inyección.

El Día 6, se recogió sangre periférica de los ratones y se midió la concentración de IL-1 β en el suero mediante un kit de ELISA disponible en el mercado (R&D Systems). Además, se fijaron bóvedas craneales extirpadas quirúrgicamente de los animales sacrificados de los Grupos B y C el día 10, con el 5% de formalina en solución salina y se descalcificaron con tratamiento con EDTA durante 3 semanas. Las bóvedas craneales descalcificadas se embebieron en compuesto OCT (Tissue-Tek™, Sakura) y se congelaron a -70°C. La tinción histoquímica para TRAP, seguida de la tinción nuclear a base de azul de metileno, identificaron células de osteoclastos maduros en el tejido de la bóveda craneal. Las células positivas para TRAP con múltiples núcleos se contaron como células de osteoclastos maduras al microscopio (a aumentos de x200).

Como se muestra en la figura 10, la inyección de RANKL y LPS en el periostio de la bóveda craneal de ratón indujo células de osteoclasto maduras positivas para TRAP en el tejido en 10 días en animales a los que se había proporcionado ADI. Por el contrario, los ratones tratados con AIN demostraron un número significativamente más bajo de células de osteoclasto positivas para TRAP en el tejido de la bóveda craneal en comparación con el grupo correspondiente al que se proporcionó ADI. Además, como se muestra en la figura 11, la tinción histológica del tejido de la bóveda craneal demostró que los osteoclastos positivos para TRAP inducidos por la inyección de RANKL/LPS eran inhibidos significativamente por el tratamiento con AIN (véase la figura 11B). Además, como se demuestra en la figura 12, la inyección de LPS/RANKL en la bóveda craneal también aumentó la concentración de IL-1 β en el suero en los ratones a los que se proporcionó ADI, mientras que el tratamiento con AIN parecía suprimir la inducción de IL-1 β . Estos resultados indican que el AIN inhibe la diferenciación de osteoclastos mediada por RANKL/LPS y la producción de citoquina proinflamatoria *in vivo*.

Ejemplo siete para fines de antecedentes

Evaluación del efecto inhibitor de AIN generada a partir de NaCl sobre la resorción ósea in vivo utilizando un modelo de inflamación periodontal de rata

Aunque el modelo de bóveda craneal de las figuras 10, 11, y 12 anteriormente demostró que AIN inhibe la diferenciación de osteoclastos mediada por RANKL/LPS y la inducción de factor inflamatorio, no estaba claro si AIN interrumpe la pérdida ósea que es inducida por RANKL. De este modo, era concebible que AIN solamente inhiba la formación de nuevos osteoclastos inducida por RANKL, pero no interrumpa la actividad de resorción ósea por las auténticas células de osteoclastos diferenciadas previamente. Para abordar esta cuestión, se empleó un modelo en rata de resorción ósea periodontal, que evaluó la pérdida ósea física inducida por la inyección periodontal de RANKL/LPS. El modelo de inflamación periodontal de rata se utilizó después de la modificación del método publicado anteriormente (Kawai, T., y otros.).

Más específicamente, ratas de la cepa Rowett (rnu/+ hembras heterocigóticas normales, de 8 semanas de edad) recibieron tres inyecciones palatales en el surco mesial del primer molar en los lados derecho e izquierdo (un total de tres puntos en cada lado) del maxilar. El tejido periodontal izquierdo recibió tres inyecciones de la mezcla de

RANKL/LPS, mientras que el lado derecho recibió tres inyecciones de solución salina de control. La inyección comprendía una mezcla de LPS (500 $\mu\text{g/ml}$) y RANKL (10 $\mu\text{g/ml}$) disuelta en solución salina (50 $\mu\text{l/animal}$) o solución salina de control sola. Desde el Día 0, cuando se inyectó la mezcla de LPS y RANKL a las ratas, se administró AIN al grupo experimental *ad libitum*, mientras que al grupo de ratas de control se le proporcionó ADI durante los 10 días del total del periodo de experimento. Los animales se sacrificaron mediante asfixia con CO_2 el día 10, las mandíbulas se descarnaron, y se midió la resorción ósea periodontal en la superficie palatal de los molares del maxilar según el método publicado anteriormente. La resorción ósea periodontal se comparó entre el lado izquierdo inyectado con RANKL/LPS y el lado derecho inyectado con solución salina de control. Las distancias desde la unión de esmalte cemento (CEJ) a la cornisa alveolar (AL) de los puntos infectados (lado palatal superior izquierdo) y puntos inyectados con solución salina de control (lado palatal superior derecho) se midieron utilizando un ocular con retícula a un aumento de 25x como se ha descrito anteriormente (Kawai, T., y otros.). Se evaluaron un total de cinco mediciones, incluyendo un punto correspondiente al eje de la raíz de la segunda y tercera raíces del primer molar, ambas raíces del segundo molar, y la primera raíz del tercer molar. La evaluación de la pérdida ósea se calculó y se expresó como el % de pérdida ósea = {(distancia CEJ-AL total de 5 puntos del lado experimental izquierdo) - (distancia CEJ-AL total de 5 puntos del lado derecho de control)} / (distancia CEJ-AL total de 5 puntos del lado derecho de control) x 100.

Como se muestra en la figura 13, la inyección de RANKL/LPS provocó aproximadamente el 15% de pérdida ósea del tejido periodontal de rata. Sin embargo, la resorción ósea inducida por la inyección de RANKL/LPS estuvo regulada negativamente de forma significativa por el tratamiento con AIN.

Ejemplo ocho para fines de antecedentes

Evaluación in vitro de los efectos de AIN sobre el crecimiento de células cancerosas

El efecto inhibidor del crecimiento de células cancerosas de AIN generada a partir de una solución del 0,12% de NaCl se estudió utilizando dos líneas celulares cancerosas humanas diferentes. Más específicamente, la línea celular de carcinoma ductal de mama humano, MDA-MB-435, y la línea de leucemia de células T aguda humana, Jurkat E6-1, se incubaron en medio DMEM/F12 suplementado con el 10% de FBS durante 24 horas en presencia de [^3H] timidina (0,5 uCi/pocillo). El medio DMEM/F12 estaba compuesto por proporciones variables de AIN frente a ADI. Después de que las células se incubaron en presencia de [^3H] timidina (0,5 uCi/pocillo) durante 24 horas, se determinó la radiactividad incorporada en las células cancerosas, que refleja la magnitud del crecimiento de las células cancerosas, mediante espectrometría de centelleo líquido. Como se muestra en la figura 14, el AIN demostró efectos inhibidores del crecimiento sobre las dos líneas celulares cancerosas humanas. En comparación con el ADI de control, el AIN suprimía significativamente el crecimiento de las líneas celulares cancerosas humanas.

Ejemplo Nueve

Las figuras muestran los resultados de varios ensayos en los que se cultivaron células RAW264.7 (10⁵ células/pocillo) en α -MEM que estaba constituido en agua desionizada no procesada (figura 29, grupo A y B), agua desionizada no procesada que contenía el 0,05% de NaHCO_3 (figura 29, grupo C), o agua desionizada que se electrolizó en presencia del 0,05% de NaHCO_3 durante dos horas (figura 29, grupo D). Todos los medios de cultivo se suplementaron con el 10% de FBS y L-glutamina 1 mM. Se aplicaron LPS de *E. coli* (0,2 $\mu\text{g/ml}$) al cultivo de los grupos B, C, y D. Después de una incubación de 24 horas, el sobrenadante del cultivo se recogió y se examinó para detectar la producción de factor inflamatorio $\text{TNF-}\alpha$ utilizando ELISA. Para supervisar el hidrógeno producido en agua durante el proceso de electrolisis, se aplicó NaCl (0,05%) solamente para comparar o NaHCO_3 (0,05%) disuelto en agua desionizada en un tanque de electroforesis y se realizó electrolisis a una corriente constante de 30 mA en una habitación fría (4-7°C, media 5,5°C). Los resultados se muestran en la figura 28. Se aplicó AIN en tubos de vidrio lavados exhaustivamente y secados al aire (8,5 ml/tubo, tubo Vacutainer, Becton Dickinson) a atmósfera convencional y sellados herméticamente con un tapón de goma. Después de dos días, se midió la concentración de hidrógeno en el espacio libre superior (4,5 ml) de cada tubo mediante un analizador de gases reductores Kappa-3 RGA-3/E001 (Trace Analytical). El aire del espacio libre superior de los tubos que contenían AIN que contenía el 0,05% de NaCl o el 0,05% de NaHCO_3 mostró que la concentración de hidrógeno era de 98 nM (AI con NaCl, electrolizada durante seis horas), 171 nM (AIN con NaHCO_3 electrolizada durante dos horas), 168 nM (AIN con NaHCO_3 electrolizada durante cuatro horas), en comparación con las concentraciones de la solución del 0,05% de NaCl de control no tratada o NaHCO_3 no tratado que eran de 0,9 nM o 0 nM, respectivamente (véase la figura 28).

Ejemplo Diez

Para supervisar la concentración de hipoclorito en el agua ionizada durante el proceso de electrolisis, se aplicó NaCl (0,05%) sólo para comparar o NaHCO_3 (0,05%) disuelto en agua desionizada en el tanque de electroforesis de Buffer Puffer™ modelo A5 (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, 2,5 l/tanque) y se realizó la electrolisis a corriente constante de 30 mA en habitación fría (4-7°C, media 5,5°C) o en el banco de laboratorio convencional a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Después de la electrolisis para los puntos temporales indicados mostrados en la figura, se muestreó el agua y se midió la concentración de hipoclorito utilizando el kit de detección de hipoclorito SZK (Sugiken, Corp, Tokio Japón) (figura 30). El AIN generada en presencia de NaCl mostró la concentración aumentada de hipoclorito en el agua electrolizada de manera dependiente del tiempo (figura 30A). Sin embargo, el AIN generada en presencia de NaHCO_3 no mostró ningún nivel detectable de hipoclorito durante el periodo de electrolisis de hasta 12 horas (figura 30B).

Para supervisar el cambio de pH del agua durante el proceso de electrolisis, se aplicó NaCl (0,05%) o NaHCO₃ (0,05%) disuelto en agua desionizada en el tanque de electroforesis de Buffer Puffer™ modelo A5 y se realizó la electroforesis a corriente constante de 30 mA en una habitación fría (4-7°C, media 5,5°C) o en un banco de laboratorio convencional a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Después de la electrolisis para los puntos temporales indicados como se muestra en la figuras, se muestreó el agua, y se midió el pH utilizando un pHmetro Accumet (Fisher Scientific) (figura 31). El AIN generada en presencia de NaCl o NaHCO₃ mostró el pH estable durante el periodo de electrolisis de hasta 12 horas, independientemente de la temperatura del agua (figura 31 A, solución de NaCl; figura 31 B, solución de NaHCO₃).

Se cultivaron células de macrófago aisladas de la cavidad peritoneal de ratón C57BL6 en α -MEM que estaba constituido en 1) agua desionizada no procesada sin NaHCO₃ (control), 2) agua desionizada no procesada que contenía el 0,05% de NaCl (0 h), o 3) agua desionizada que se electrolizó en presencia del 0,05% de NaCl durante diversos periodos a la temperatura ambiente (figura 32A) o en una habitación fría (figura 32B). Después de la generación de cada tipo de agua, el agua resultante, independientemente de la electrolisis (tiempo 0-12 horas), se mantuvo a la temperatura ambiente o en una habitación fría hasta el ensayo de cultivo de macrófago. Todos los medios de cultivo se suplementaron por igual con el 10% de FBS (suero fetal bovino) y L-glutamina 1 mM. Se aplicaron LPS de *E. coli* (2 μ g/ml) al cultivo. Después de 24 horas de incubación, se recogió el sobrenadante del cultivo y se examinó para detectar la producción del factor inflamatorio TNF- α utilizando ELISA. *, significativamente más bajo que el grupo # mediante el test t de Student (P < 0,05). El AIN con NaCl generado a temperatura ambiente no mostró ningún cambio significativo de la expresión de TNF- α por macrófagos estimulados con LPS (figura 32A). Sin embargo, el AIN con NaCl generada en una habitación fría, que se electrolizó durante más de 2 horas, suprimió significativamente la expresión de TNF- α por macrófagos estimulados con LPS (figura 32B).

Macrófagos de ratón aislados de la cavidad peritoneal, análogamente a la figura 32, se cultivaron en α -MEM que se constituyó en 1) agua desionizada no procesada sin NaHCO₃ (control), 2) agua desionizada no procesada que contenía el 0,05% de NaHCO₃ (0 horas), o 3) agua desionizada que se electrolizó en presencia del 0,05% de NaHCO₃ durante diversos periodos a la temperatura ambiente (figura 33A) o en una habitación fría (figura 33B). Todos los medios de cultivo se suplementaron por igual con el 10% de FBS (suero fetal bovino) y L-glutamina 1 mM. Se aplicaron LPS de *E. coli* (2 μ g/ml) al cultivo. Después de 24 horas de incubación, se recogió el sobrenadante del cultivo y se examinó para detectar la producción de factor inflamatorio TNF- α utilizando ELISA. *, significativamente más bajo que el grupo # mediante test t de Student (P < 0,05). El AIN con NaHCO₃ generada a temperatura ambiente no mostró ningún cambio significativo de la expresión de TNF- α por macrófagos estimulados con LPS (figura 33A). Sin embargo, el AIN con NaHCO₃ generada en una habitación fría, que se electrolizó durante más de una hora, suprimía significativamente la expresión de TNF- α por macrófagos estimulados con LPS (figura 33B).

Ejemplo once para fines de antecedentes

Efectos in vivo del AIN sobre la inducción de colitis

Para determinar los efectos del agua ionizada de la presente invención sobre colitis inducida por DDS, a ratones C57BL/6J (machos de 8 semanas de edad, 4/grupo) se les administró dextrán sulfato sódico (4%) en AIN o en ADI suplementada con el 0,12% de NaCl como agua para beber *ad libitum*. El peso corporal de cada animal se midió cada día durante el periodo total del experimento de 9 días (figura 23). El peso corporal perdido se convirtió en % de pérdida en base al peso corporal en el Día 0. El animal mantenido con AIN redujo la pérdida de peso corporal en comparación con el grupo de animales a los que se administró ADI (figura 23). *, **, ***, significativamente más alto que el grupo de control de animales tratados con ADI mediante test de Student (P < 0,05, P < 0,01 o P < 0,001, respectivamente).

Ejemplo doce para fines de antecedentes

Efectos preventivos in vivo de AIN sobre la inducción de hepatitis aguda

Para determinar los efectos del agua ionizada de la presente invención sobre la prevención del inicio de hepatitis aguda, se trataron ratones C57BU6 con el agua respectiva, ADI (agua desionizada, control), AIN con NaCl o AIN con NaHCO₃ durante tres días por adelantado (día 3) a la inyección de Con A (15 mg/kg). El AIN con NaCl o el AIN con NaHCO₃ se generó mediante electrolisis de agua desionizada en presencia del 0,05% de NaCl o el 0,05% de NaHCO₃ durante seis horas en una habitación fría. Se aislaron sueros sanguíneos de animales antes (0 horas) y 16 horas después de la inyección de ConA. La concentración de TNF- α en el suero se midió mediante ELISA (figura 25A). *, significativamente más baja que el grupo # mediante test t de Student (P < 0,05). **, significativamente más alta que el grupo ## mediante test t de Student (P < 0,05). Se evitó el nivel de TNF- α en suero aumentado inducido por la inyección de ConA mediante el pre-tratamiento de los animales con AI con NaCl y AI con NaHCO₃.

La figura 25B indica las fotos histológicas de los hígados de ratones (C57BU6) con hepatitis inducida con ConA. Los ratones se trataron con el agua respectiva *ad libitum*; ADI de control (figura 25A y figura 25B), AIN con NaCl (figura 25C) o AIN con NaHCO₃ (figura 25D) durante tres días por adelantado a la inyección de Con A (15 mg/kg). Dieciséis horas después de la inyección de Con A, los animales se sacrificaron y se muestrearon los hígados. Los hígados muestreados se seccionaron mediante un aparato Cryostat (grosor de 8 μ m) y se tiñeron con hematoxilina para el análisis histoquímico. Cada sección se examinó utilizando un microscopio y la imagen se capturó mediante una cámara digital (aumentos de x400). Las figuras 25B y 25C muestran la formación de vacuolización patógena, un

signo de daño celular, en los hepatocitos. El pre-tratamiento de los ratones don AIN con NaHCO₃ inhibió la inducción de dicha vacuolización patógena en los hepatocitos de ratones que recibieron inyección de ConA.

En toda esta solicitud, autores y años y patentes mediante número hacen referencia a diversas publicaciones, incluyendo Patentes de Estados Unidos. Las citaciones completas para las publicaciones se enumeran a continuación.

Referencias

Ghirardi, M. L., P. W. King, M. C. Posewitz, P. C. Maness, A. Fedorov, K. Kim, J. Cohen, K. Schulten, y M. Seibert. 2005. Approaches to developing biological H(2)-photoproducing organisms and processes [Enfoque para desarrollar organismos y procesos biológicos H(2)-fotoinductores]. *Biochem Soc Trans* 33: 70-2.

Grisham, M. B., D. Jourdh'euil, y D. A. Wink. 2000. Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism-implications in DNA damage and mutagenesis. [Artículo de revista: implicaciones de la inflamación crónica y el oxígeno reactivo y el metabolismo del nitrógeno en el daño al ADN y la mutagénesis] *Aliment Pharmacol Ther* 14 Suppl 1: 3-9.

Kawai, T., R. Eisen-Lev, M. Seki, J. W. Eastcott, M. E. Wilson, y M. A. Taubman. 2000. Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. [Necesidad de con coestimulación de B7 para la resorción ósea mediada por Th1 en enfermedad periodontal experimental] *J. Immunol.* 164: 2102-2109.

Lavrovsky, Y., B. Chatterjee, R. A. Clark, y A. K. Roy. 2000. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases. [Papel de los factores de transcripción regulados por redox en la inflamación, el envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad] *Exp Gerontol* 35: 521-32.

Li, L., A. Khansari, L. Shapira, D. T. Graves, y S. Amar#. 2002. Contribution of interleukin-11 and prostaglandin(s) in lipopolysaccharide-induced bone resorption *in vivo*. [Contribución de interleuquina-11 y prostaglandinas en resorción ósea *in vivo* inducida por lipopolisacáridos] *Infect Immun* 70: 3915-22.

Rutala, W. A., y D. J. Weber. 1997. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. [Utilizaciones de hipoclorito inorgánico (lejía) en instalaciones de atención sanitaria] *Clin Microbiol Rev* 10: 597-610.

Shirahata, S., S. Kabayama, M. Nakano, T. Miura, K. Kusumoto, M. Gotoh, H. Hayashi, K. Otsubo, S. Morisawa, y Y. Katakura. 1997. Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. [El agua reducida electrolizada elimina especies de oxígeno activo y protege al ADN del daño oxidativo] *Biochem Biophys Res Commun* 234: 269-74.

Valverde, P., T. Kawai, y M. A. Taubman. 2002. Kaliotoxin decreases receptor activator of NFkB ligand (RANKL) expression in activated T cells *in vitro* and ameliorates local inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. [La kaliotoxina disminuye la expresión del ligando del receptor activador de NFkB (RANKL) en células T activadas *in vitro* y mejora la resorción ósea inflamatoria local en enfermedad periodontal experimental] *J. Bone Min. Res.* 17: S213.

Winterbourn, C. C. 2002. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. [Reactividad biológica y biomarcadores del oxidante de neutrófilos, ácido hipocloroso] *Toxicology* 181-182: 223-7.

REIVINDICACIONES

5 1. Método de formación de agua ionizada neutra libre de hipoclorito enriquecida en hidrógeno, que comprende las etapas de:

10 disolver una sal que no genera hipoclorito en agua a una concentración del 0,05 al 0,2% y electrolizar el agua que contiene la sal disuelta a una temperatura de entre 4 y 9°C, en el que dicha agua se selecciona entre el grupo que comprende agua corriente, agua destilada, agua blanda, agua desionizada, y agua formada a través de una membrana de ósmosis inversa, en el que se realiza la electrolisis manteniendo un intervalo de voltaje de 1 a 30 V y una densidad de corriente en un intervalo de 5 a 300 A/dm².

15 2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de realización incluye electrolizar haciendo pasar a una corriente entre, como mínimo, dos electrodos colocados a distancia en ambos extremos de un baño de electrolisis.

3. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha etapa de realización incluye permitir que el hidrógeno gaseoso producido se desplace a través de un tubo para alcanzar un extremo distante del baño de electrolisis donde está situado un cátodo, aumentando de este modo el proceso de disolución de hidrógeno.

20 4. Método, según la reivindicación 1, que incluye además agitar de forma continua el agua durante dicha etapa de realización.

25 5. Método, según la reivindicación 4, en el que dicha etapa de agitación incluye agitar utilizando un agitador magnético.

30

35

40

45

50

55

60

65

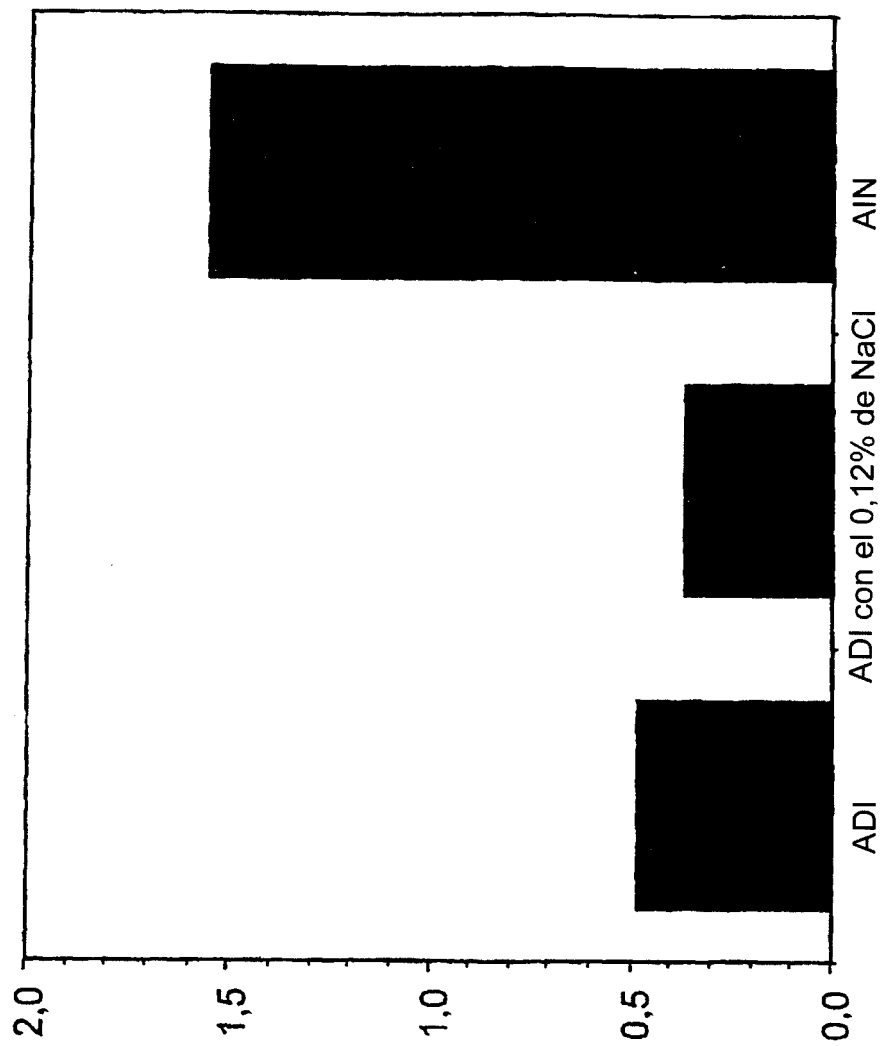


Figura 1

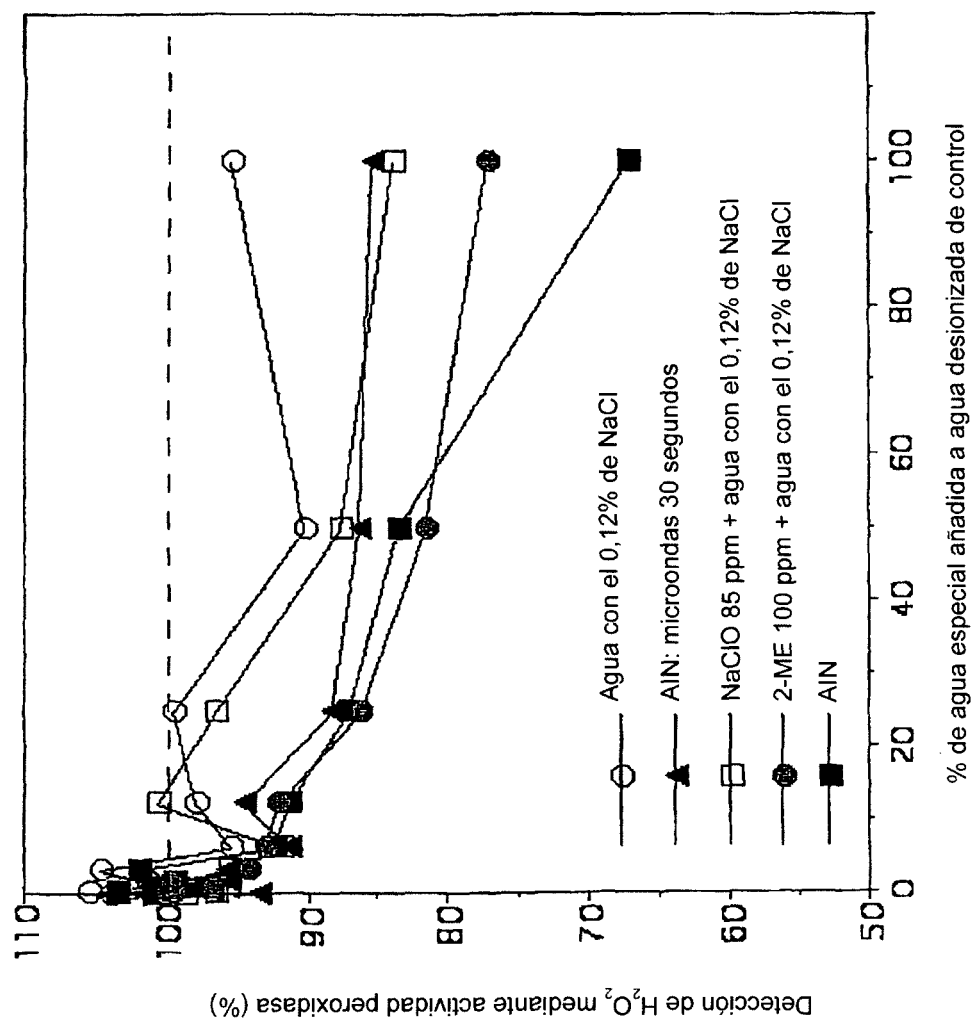
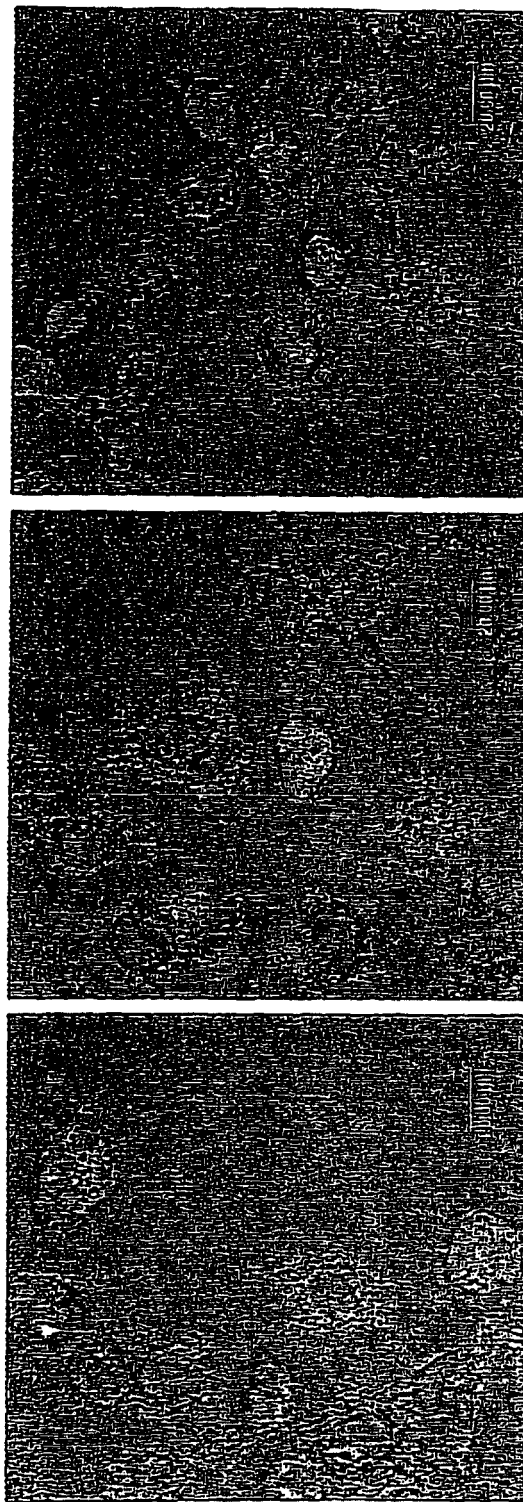


Figura 2

Células Tratadas con LPS



A) 0,12% de NaCl B) 0,12% de NaCl + 85 ppm de NaClO C) AIN

Figura 3A

Células no tratadas

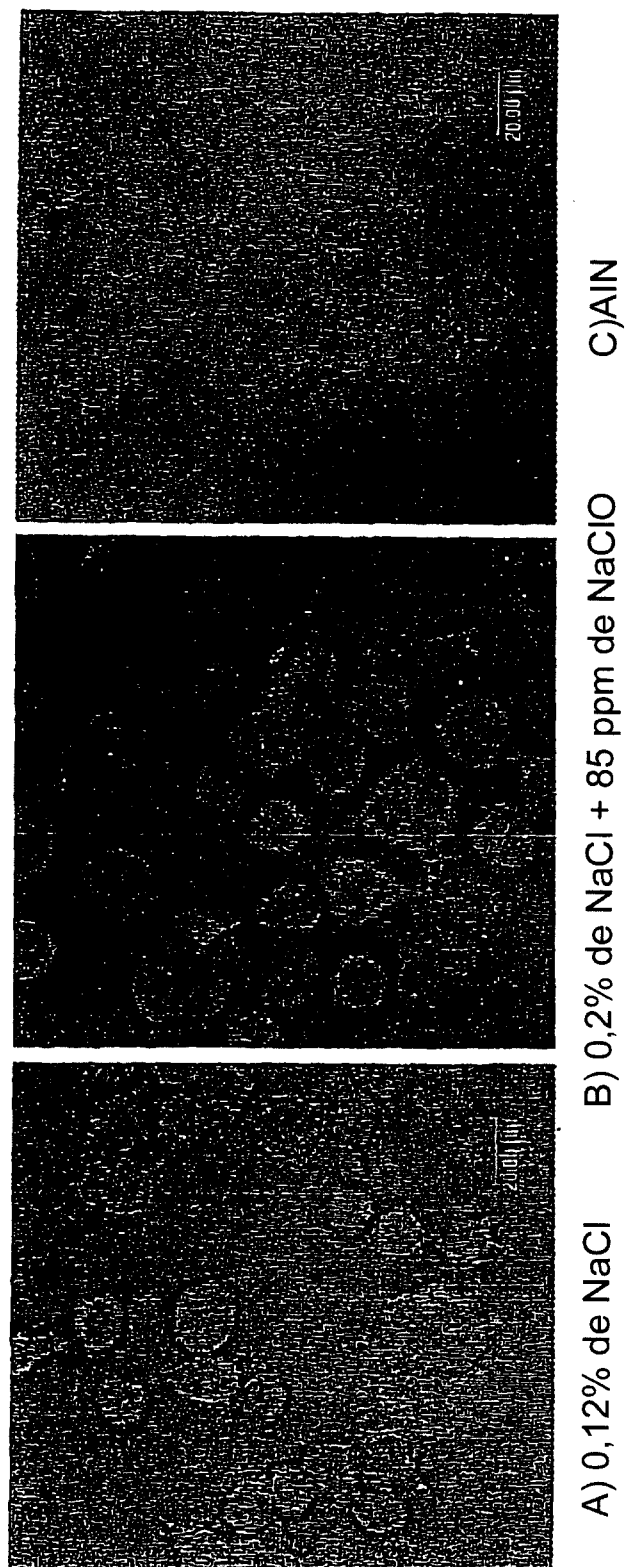


Figura 3B

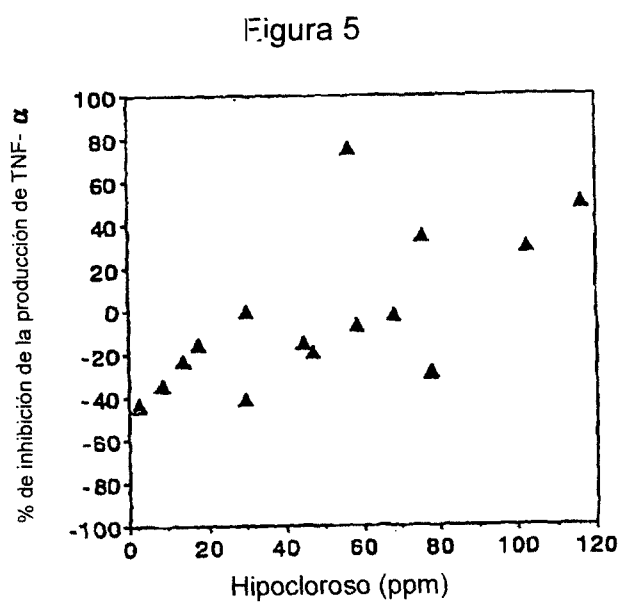
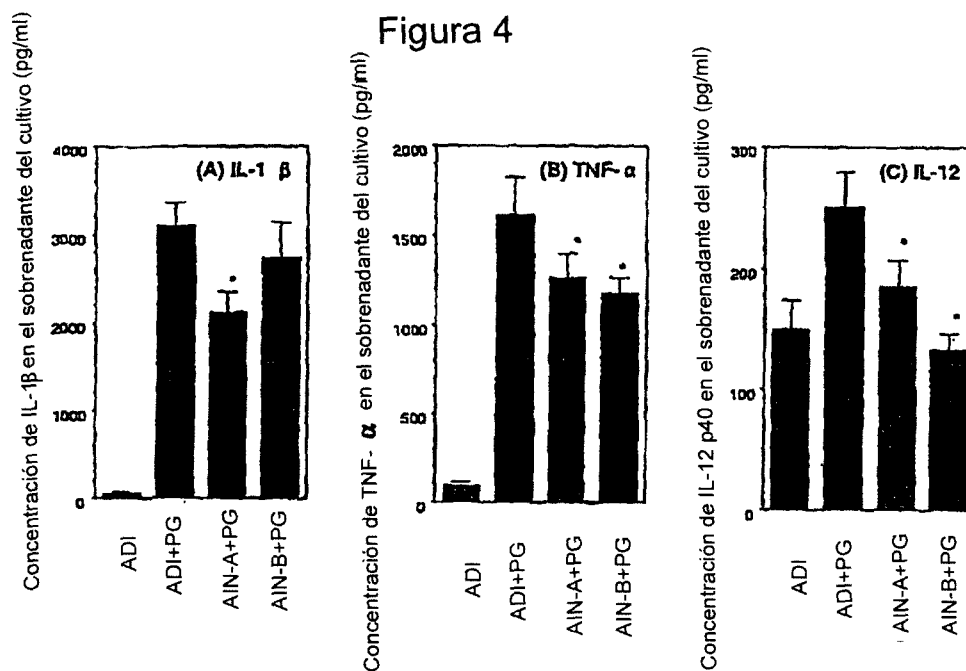


Figura 6

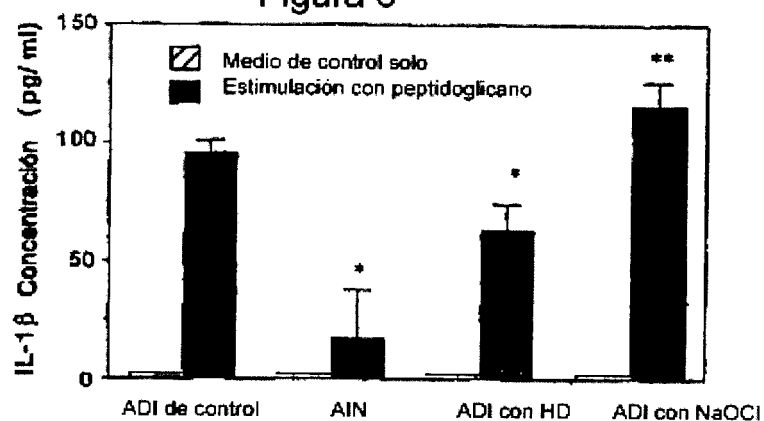


Figura 7

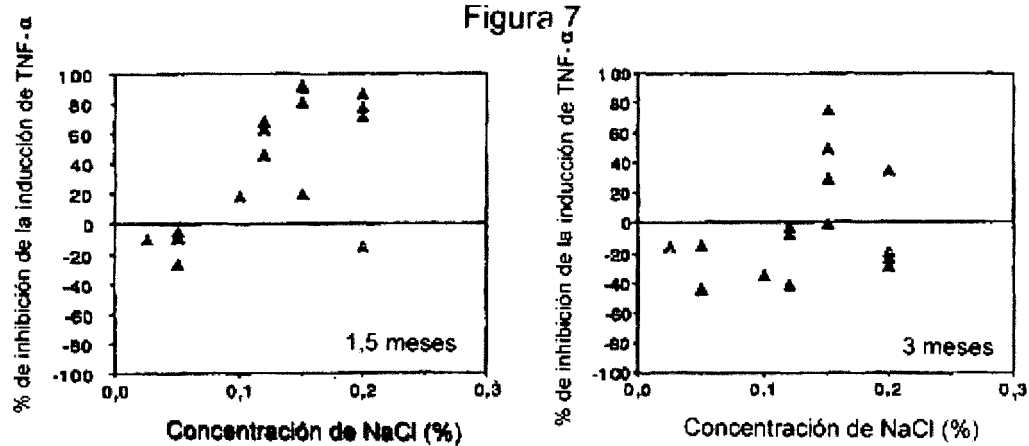
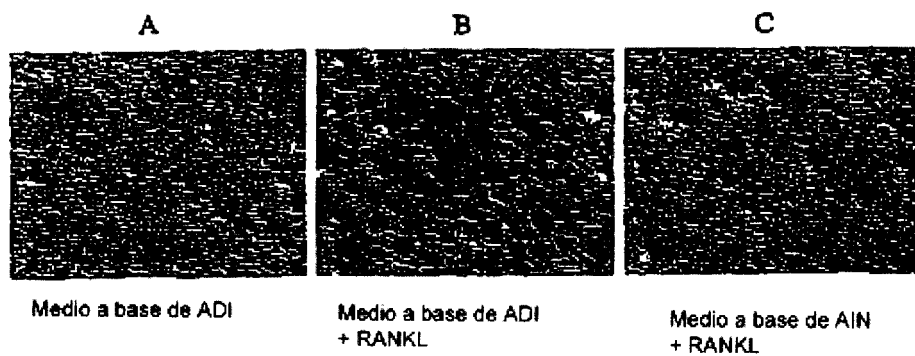
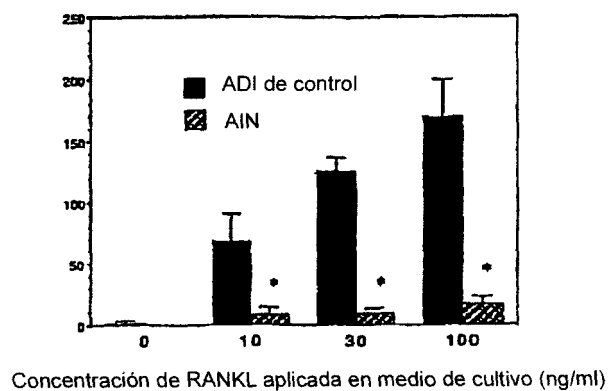


Figura 8



Células multinucleares TRAP+/pocillo

Figura 9



Nº de Células multinucleares TRAP+/campo del microscopio

Figura 10

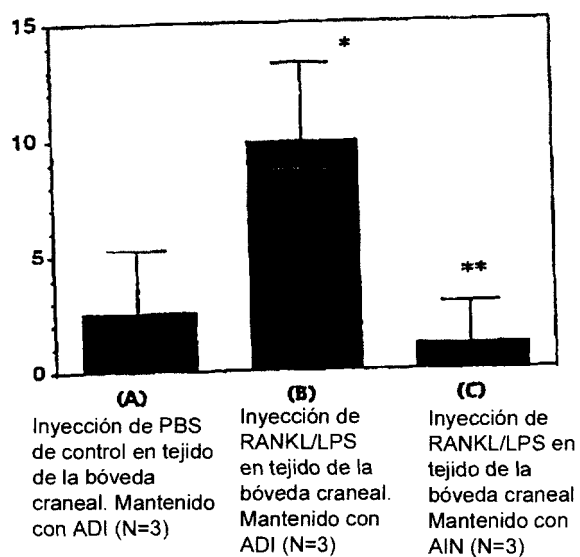


Figura 11

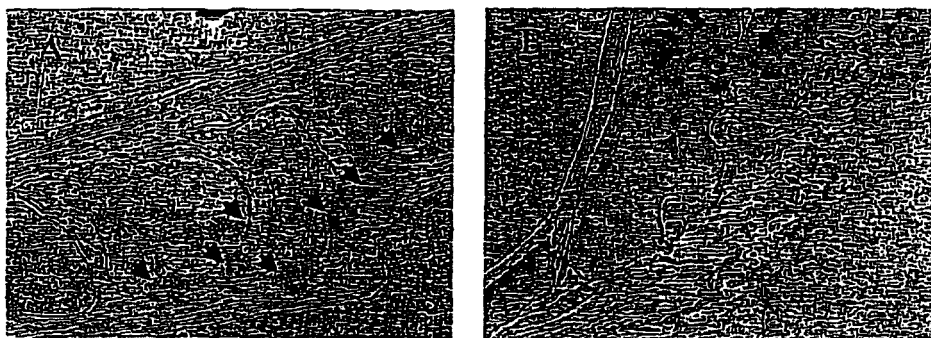


Figura 12

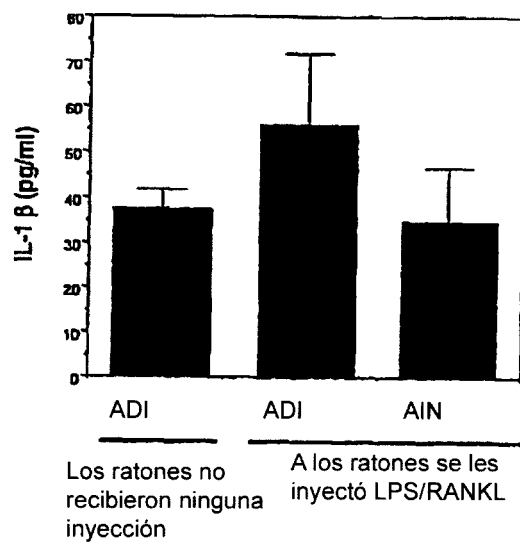


Figura 13

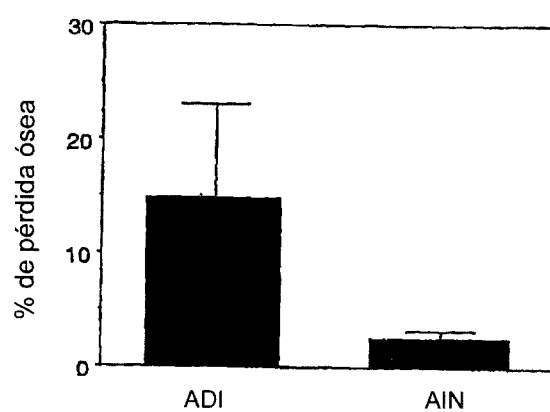
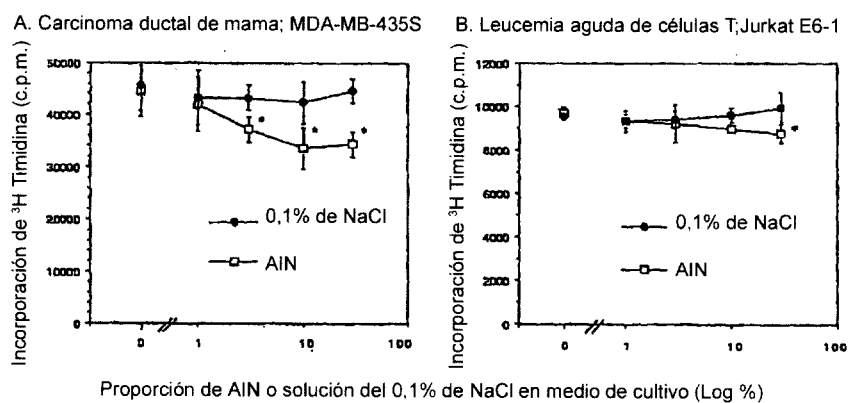


Figura 14



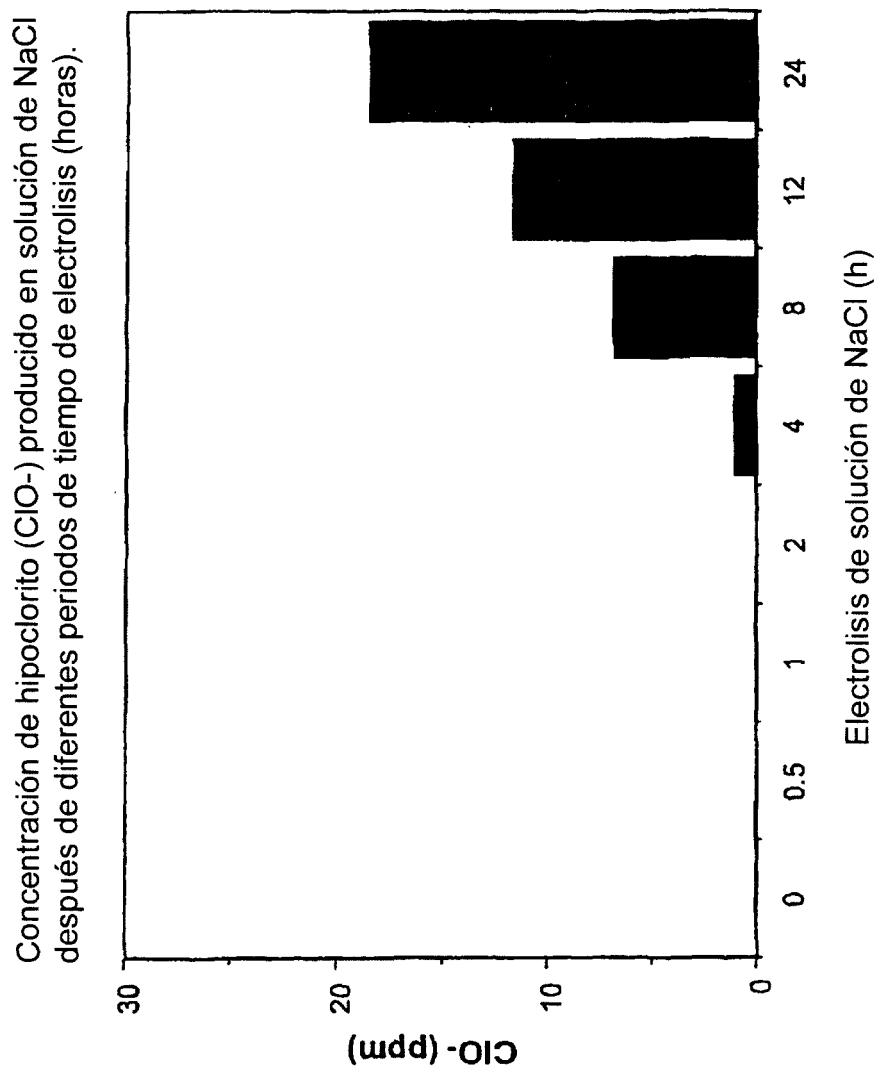


Figura 15

Producción de TNF- α por células RAW264.7 cultivadas en Al Forsyth
electrolizada durante diferentes periodos de tiempo

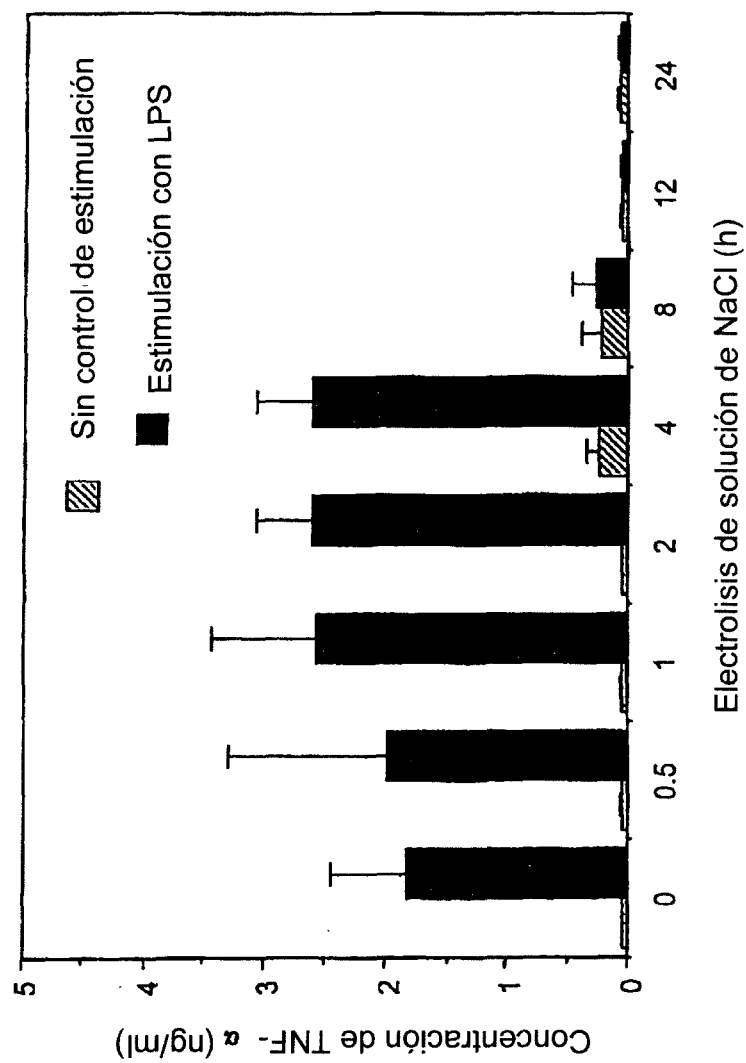


Figura 16

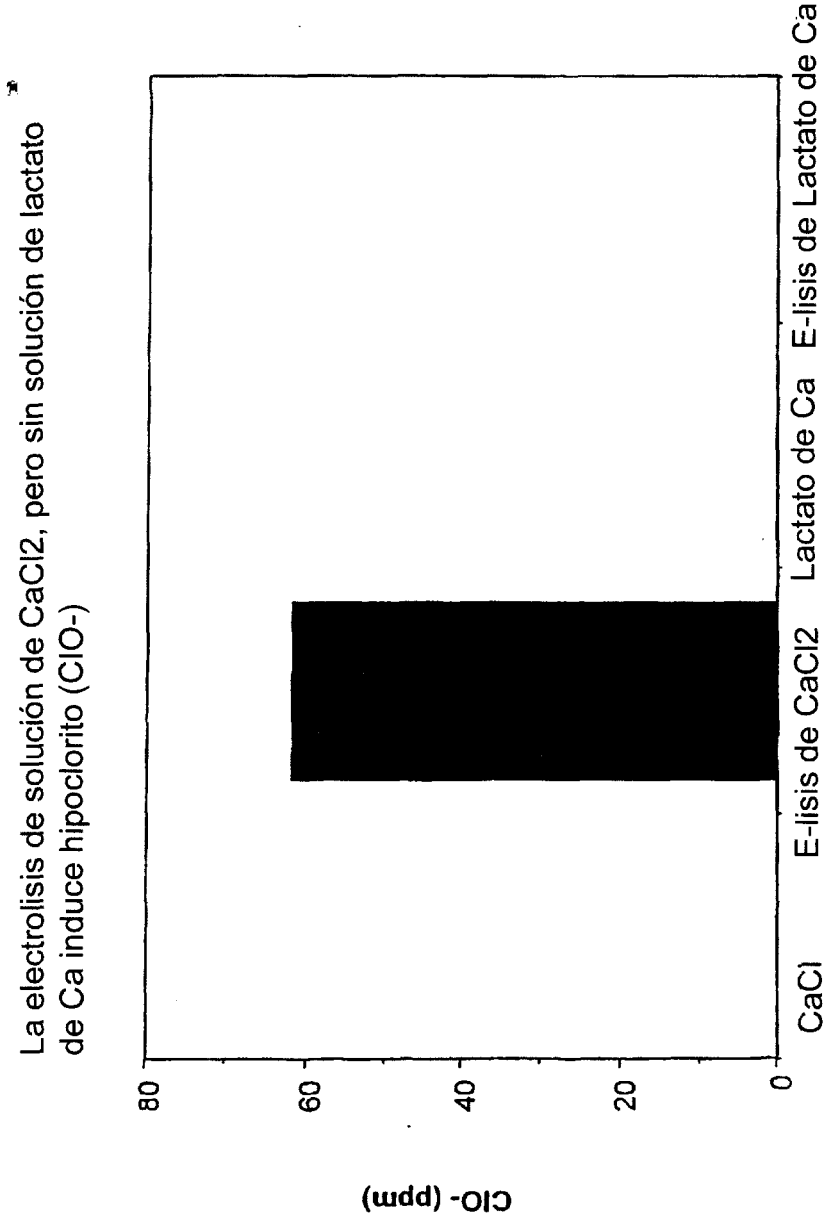


Figura 17

La solución de lactato de Ca electrolizada posee efectos antiinflamatorios
Producción de TNF - α por células RAW264.7 estimuladas con LPS

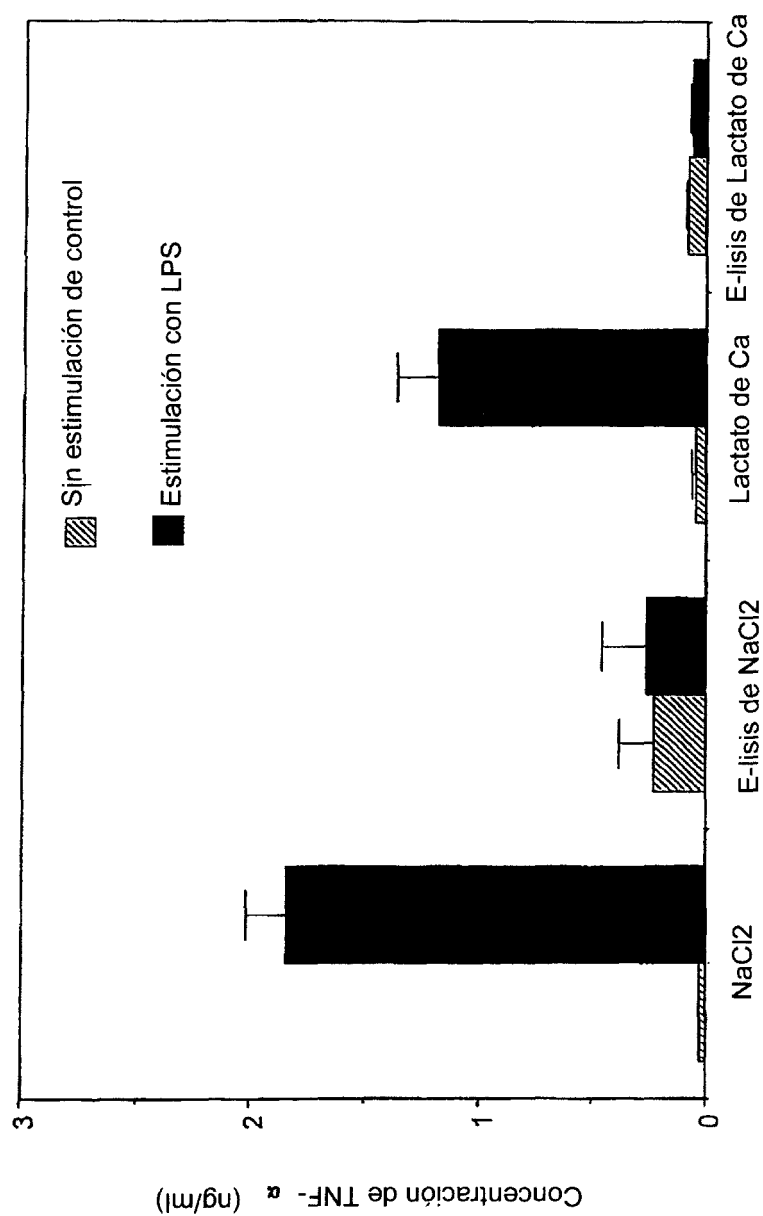


Figura 18

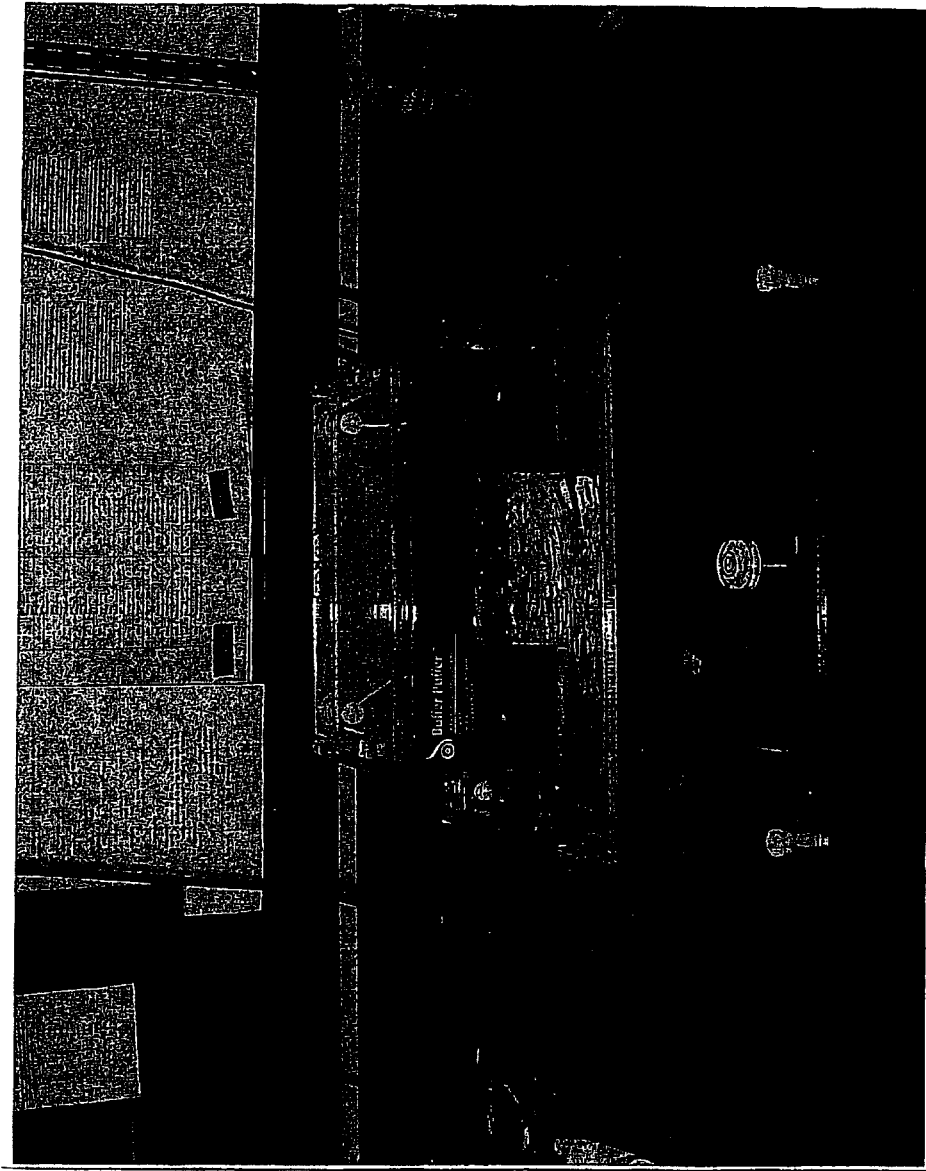


Figura 19

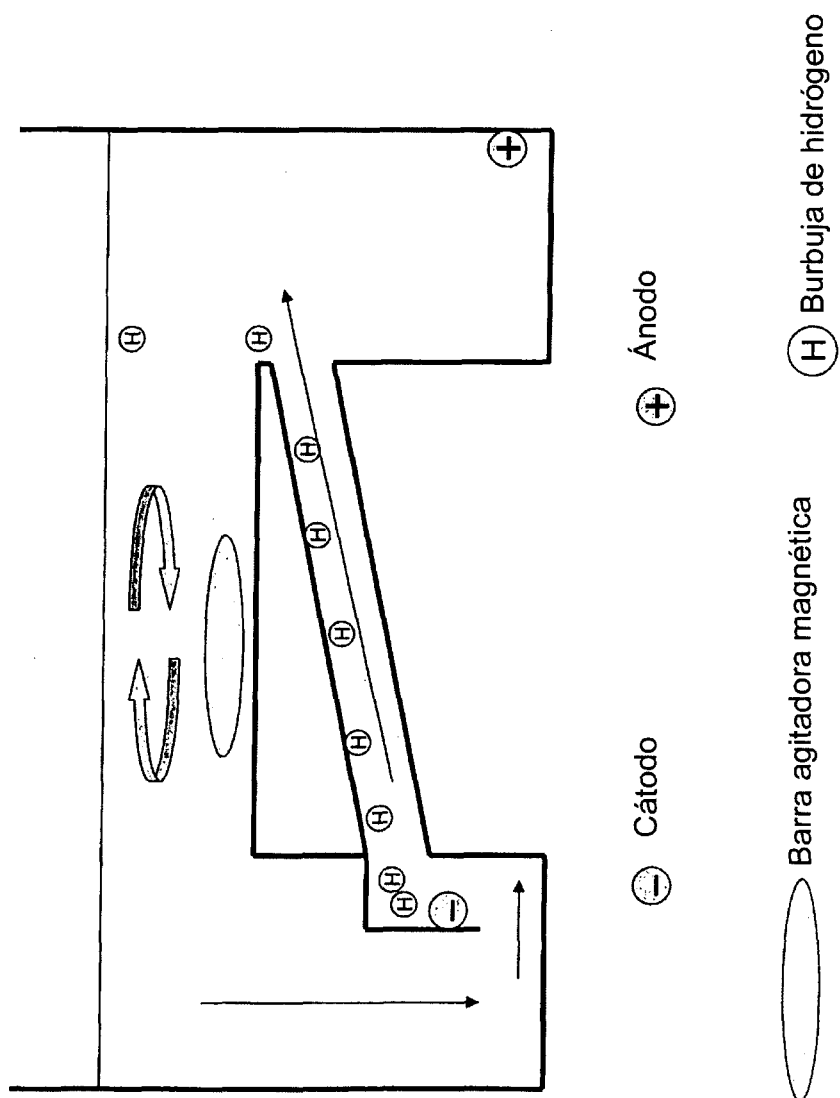


Figura 20

Efectos de la agitación sobre el pH del agua durante la electrolisis

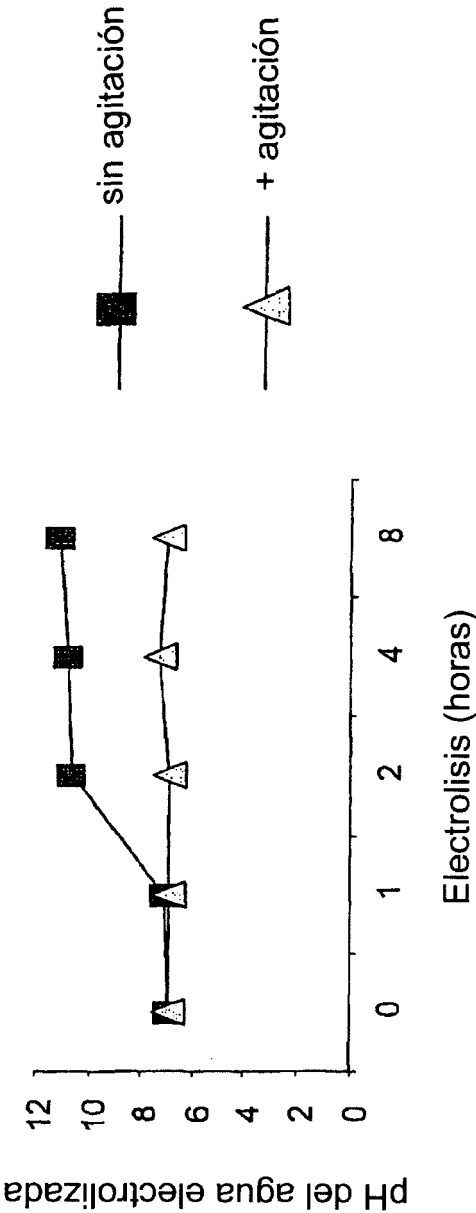


Figura 21

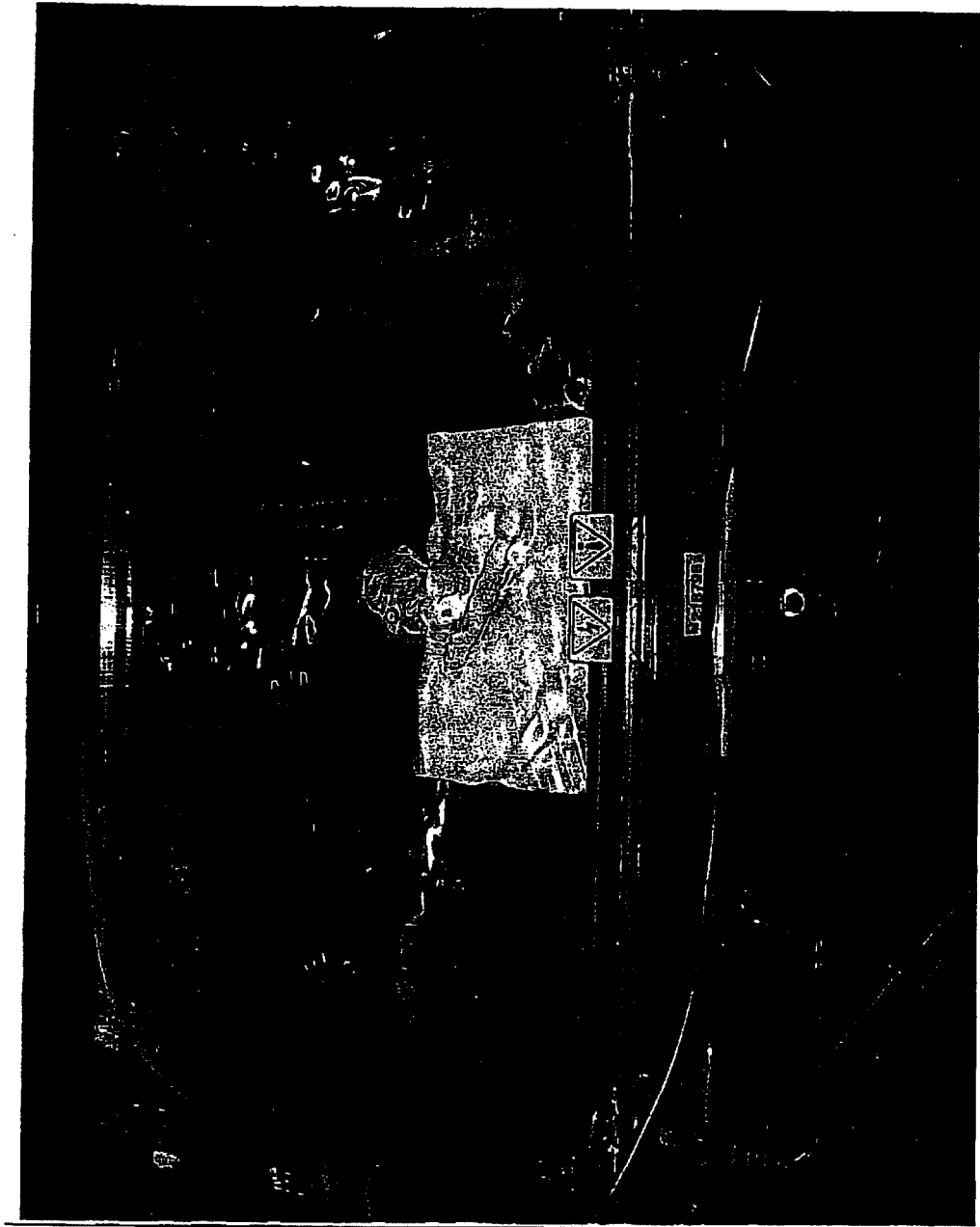
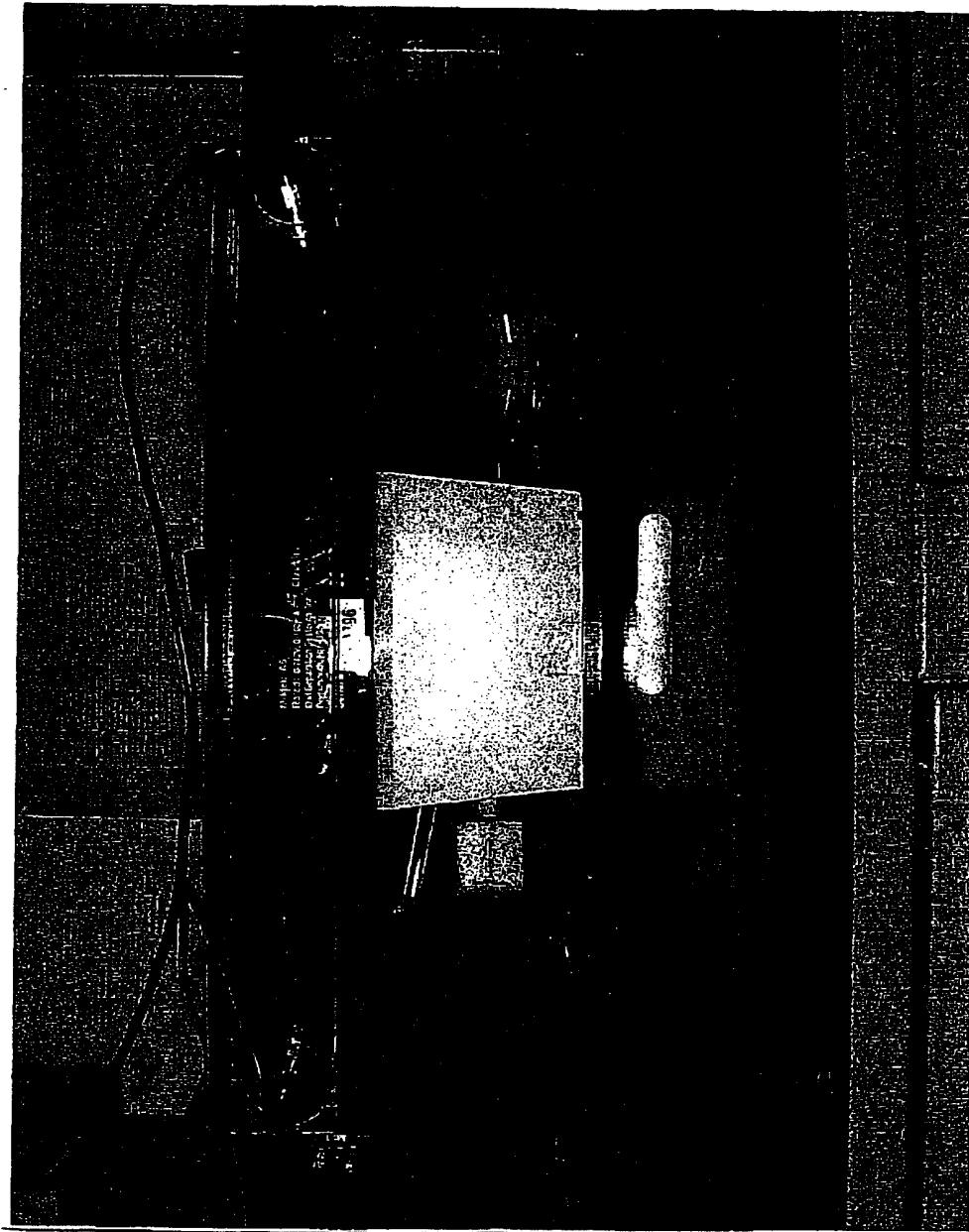


Fig 22



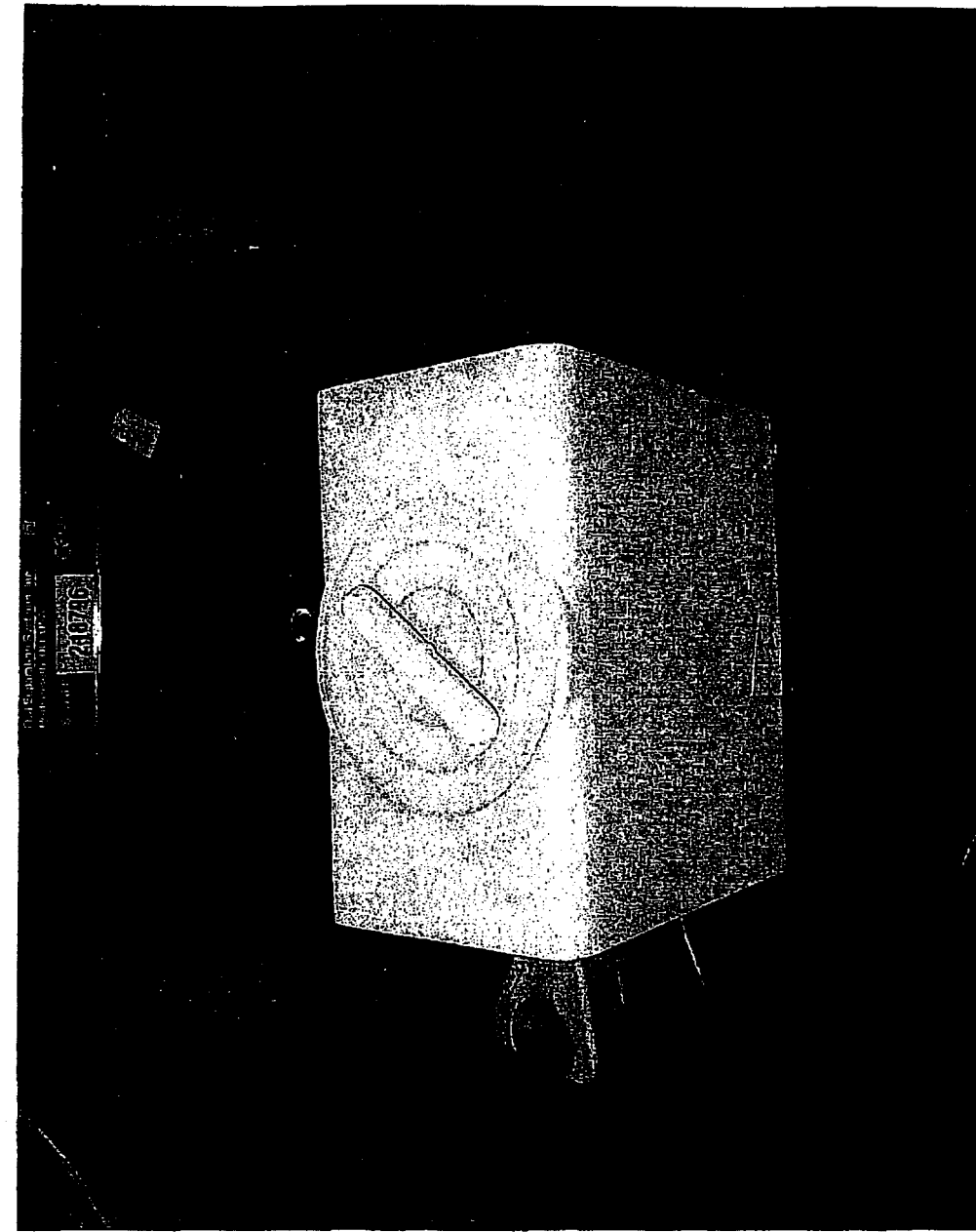
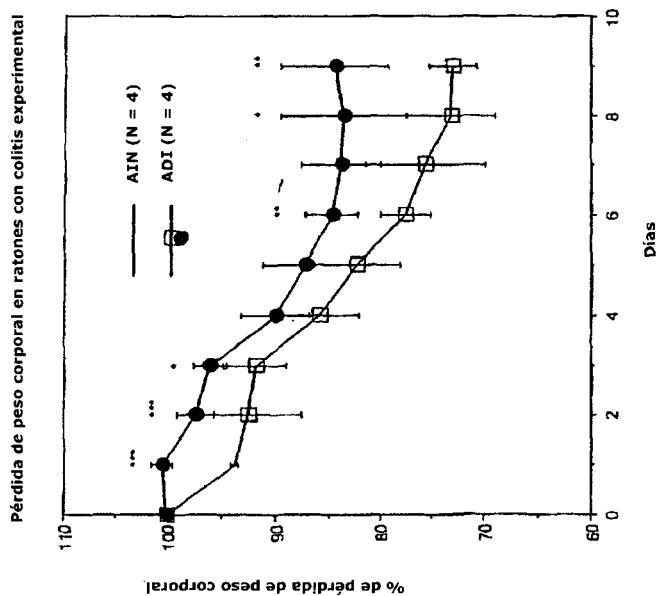


Fig. 22b



Efectos del AIN sobre la pérdida de peso corporal en ratones con colitis inducida por DDS.

A los ratones C57BL/6J (machos de 8 semanas de edad, 4/grupo) se les administró dextrán sulfato sódico (4%) en AIN o ADI suplementada con el 0,12% de NaCl como agua para beber ad libitum. El peso corporal de cada animal se midió cada día durante el periodo total del experimento de 9 días. El peso corporal perdido se convirtió en % de pérdida en base al peso corporal en el Día 0. El animal mantenido con AIN redujo la pérdida de peso corporal en comparación con el grupo de animales a los que se administró ADI. *, **, ***, significativamente más alto que el grupo de control de animales tratados con ADI mediante test t de Student ($P < 0,05$, $P < 0,01$ o $P < 0,001$, respectivamente).

Fig 23

Diferentes temperaturas

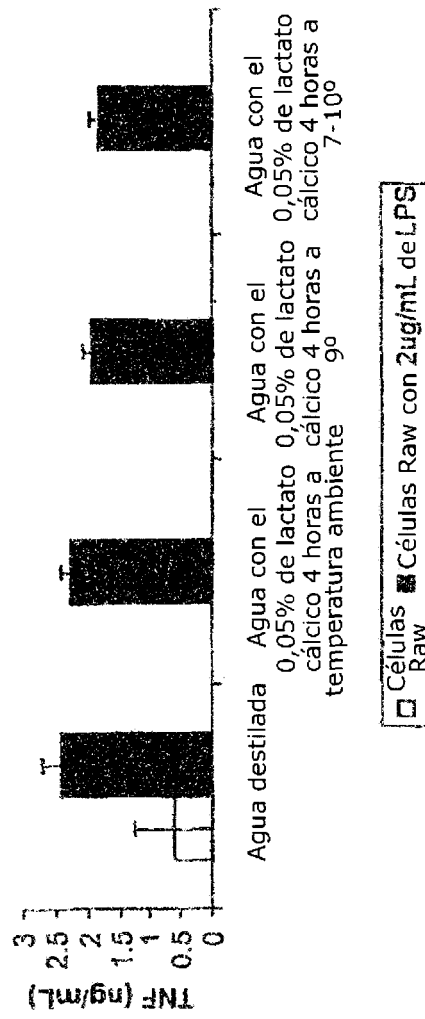


Fig 24 A

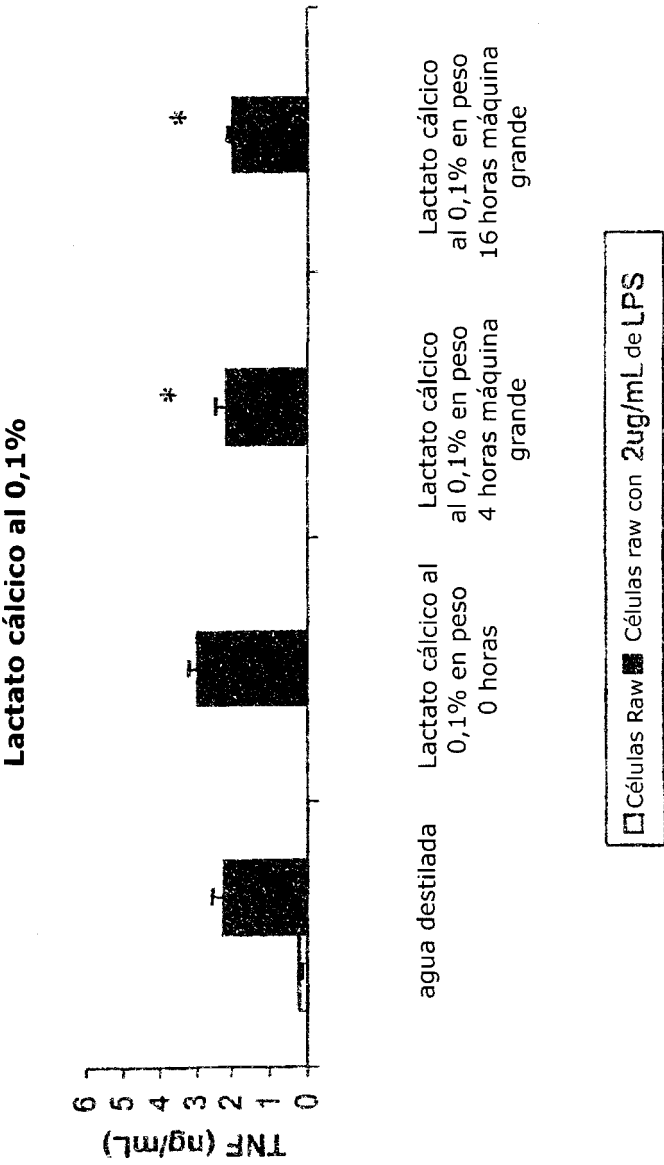


Fig 24B

Hepatitis de ratón (inflamación del hígado) inducida mediante inyección i.v. de Concanavalina A (Con A) a ratones C57BK/6: se evitó el aumento del nivel de $\text{TNF-}\alpha$ en suero inducido por la inyección de ConA mediante el pre-tratamiento de los animales con AI con NaCl y AI con NaHCO_3

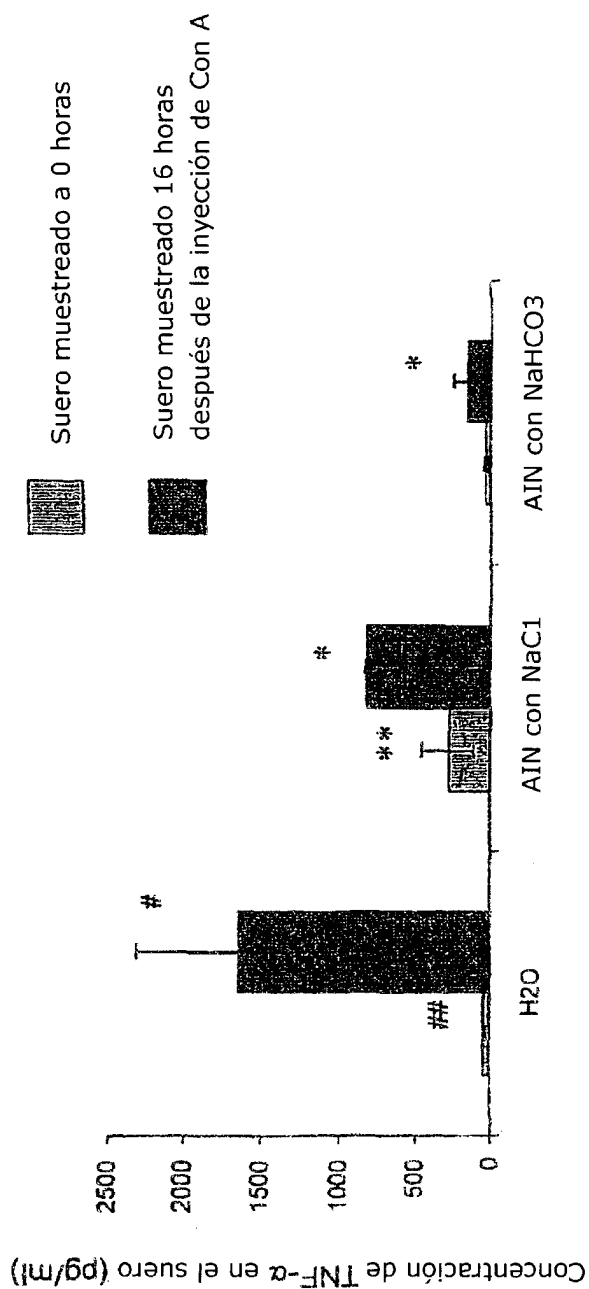
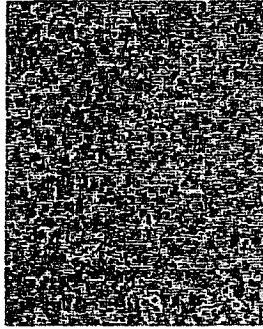


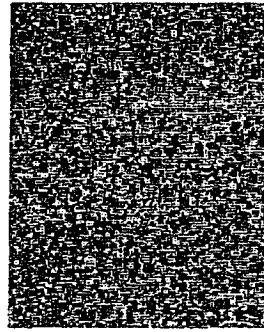
Figura 25A

Evaluación histoquímica de hepatitis de ratón (inflamación del hígado) inducida mediante inyección i.v. de Concavalina A (Con A) a ratones C57BL/6: la vacuolización inducida en hepatocitos por ConA se suprimió mediante el pre-tratamiento de animales con AI con NaHCO₃

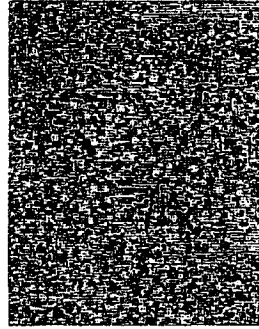
A. El hígado de ratón recibió inyección simulada de control con solución salina. Pre-tratado con ADI de control



B. El hígado de ratón recibió Con A Pre-tratamiento con ADI de control



C. El hígado de ratón recibió Con A Pre-tratado con AIN con NaCl



D. El hígado de ratón recibió Con A Pre-tratado con AIN con NaHCO₃

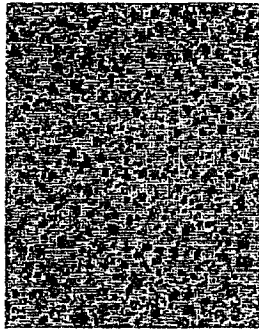


Figura 25B

**Producción de óxido nítrico por células RAW264.7
Estimulación con LPS durante 24 horas**

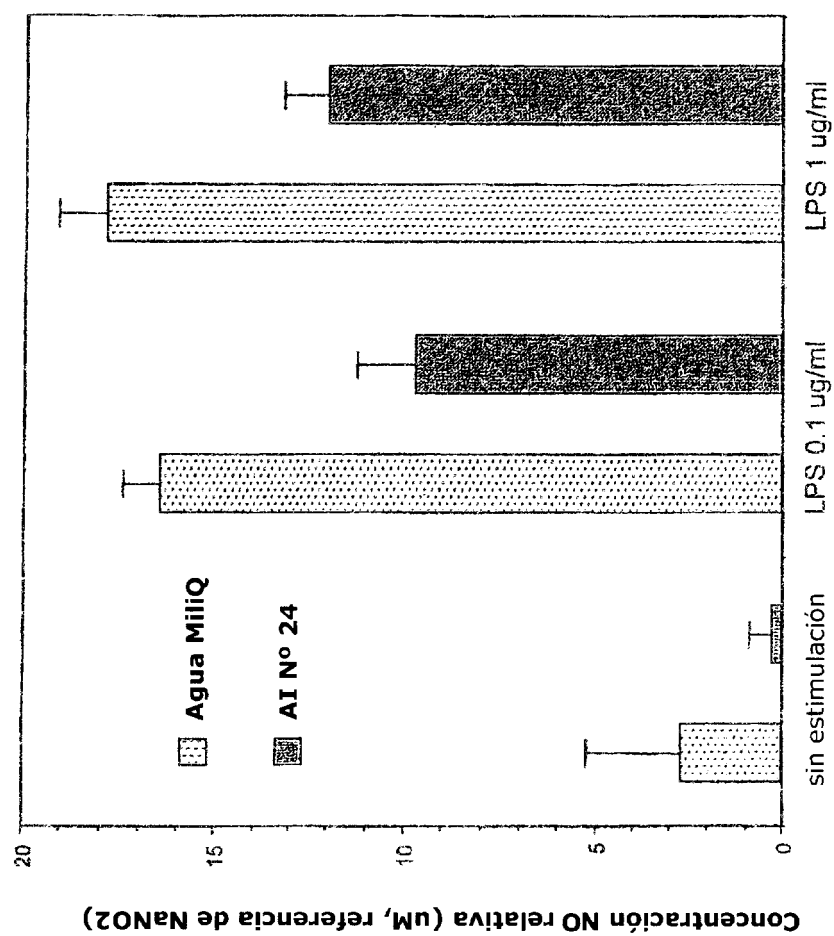


Fig 26

Diferenciación de osteoclastos inducida por células RAW264.7 estimulación con RANKL durante 6 días

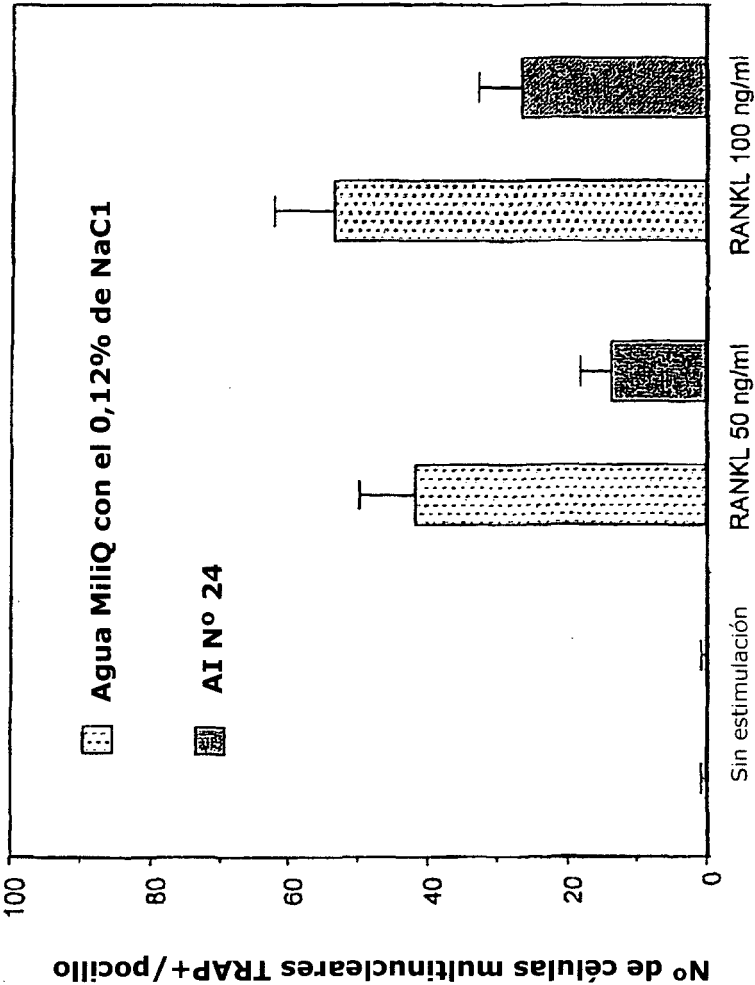
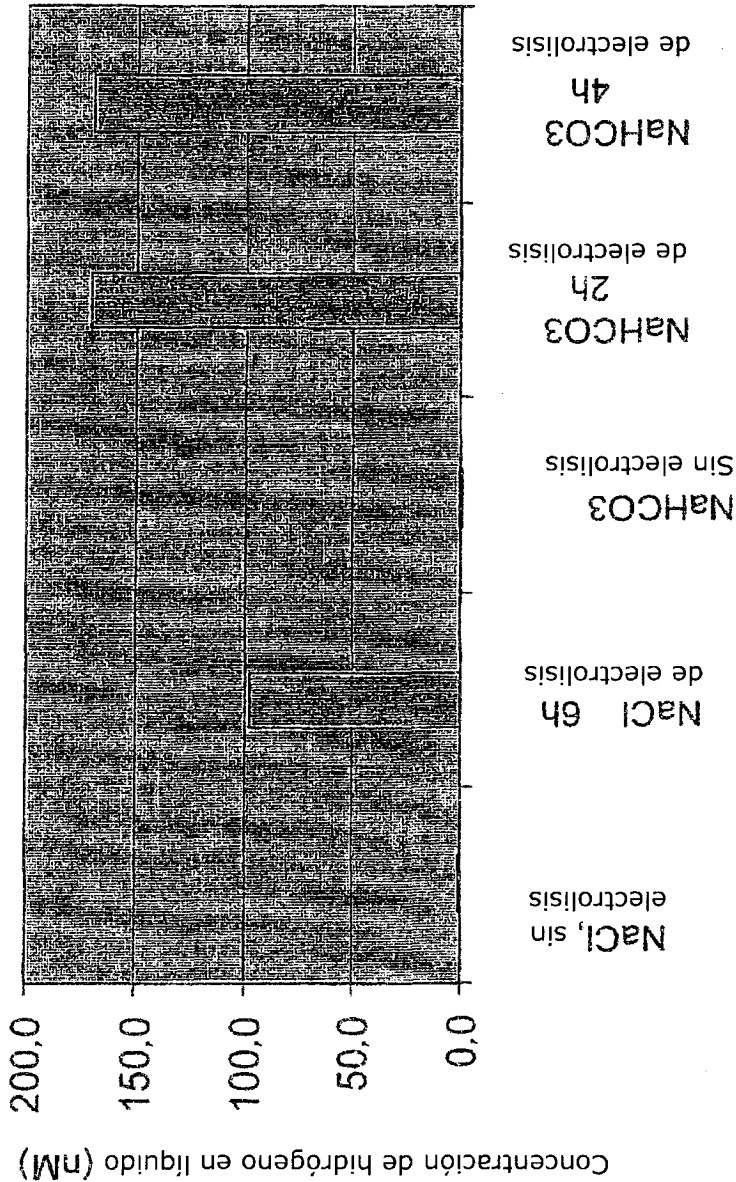


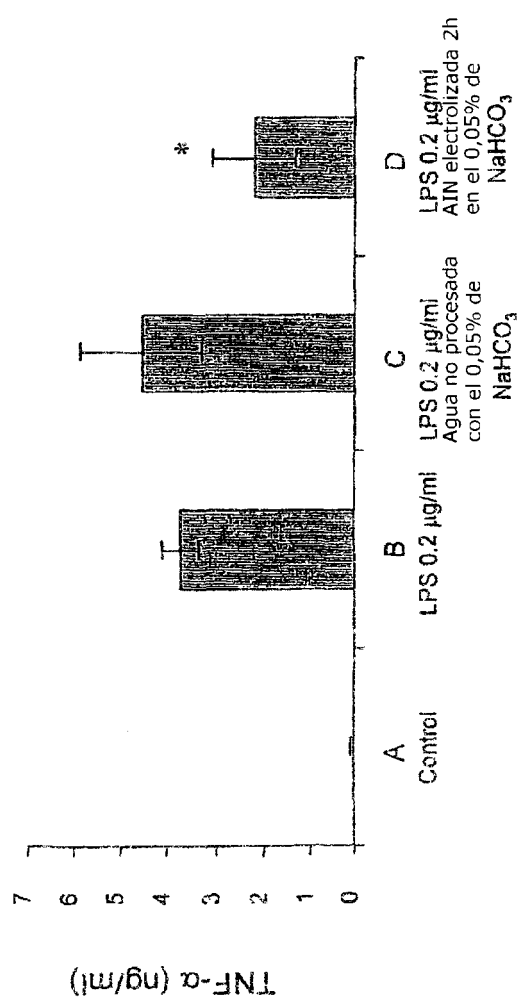
Fig 27



Para supervisar el hidrógeno producido en agua durante el proceso de electrolisis, se aplicó NaCl (0,05%) disueltos en agua desionizada en el tanque de electroforesis de Buffer Puffer™ modelo A5 (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, 2,5 l/tanque) y se realizó la electrolisis a corriente constante de 30 mA en una habitación fría (4-7°C, media 5,5°C). Después de la electrolisis durante los puntos temporales indicados que se muestran en la figura, se muestreó el agua y se midió el hidrógeno disuelto en el agua.

Fig 28

Efectos antiinflamatorios mediante un agua ionizada que se generó mediante una electrolisis en presencia del 0,05% de NaCHO₃ (es decir, bicarbonato de sosa).

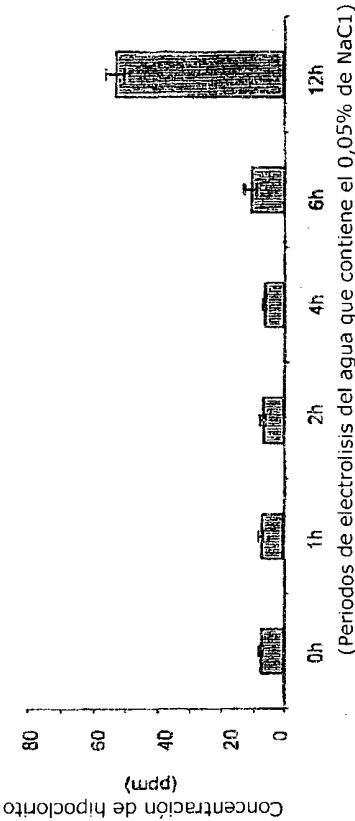


Se cultivaron células RAW264.7 (10⁵ células/pocillo) en α-MEM que se había constituido en 1) agua desionizada no procesada (A & B), 2) agua desionizada no procesada que contenía el 0,05% de NaHCO₃ (C) o 3) agua desionizada que se electrolizó en presencia del 0,05% de NaHCO₃ durante 2 horas (D). Todos los medios de cultivo se suplementaron por igual con el 10% de FBS (suero fetal bovino) y L-glutamina 1 mM. Se aplicaron LPS de *E. coli* (0.2 µg/ml) al cultivo de los grupos B, C y D. Después de 24 horas de incubación, se recogió el sobrenadante del cultivo y se examinó para detectar la producción de factor inflamatorio TNF-α utilizando ELISA. *, significativamente más bajo que el grupo B o C mediante test t Student (P < 0,05).

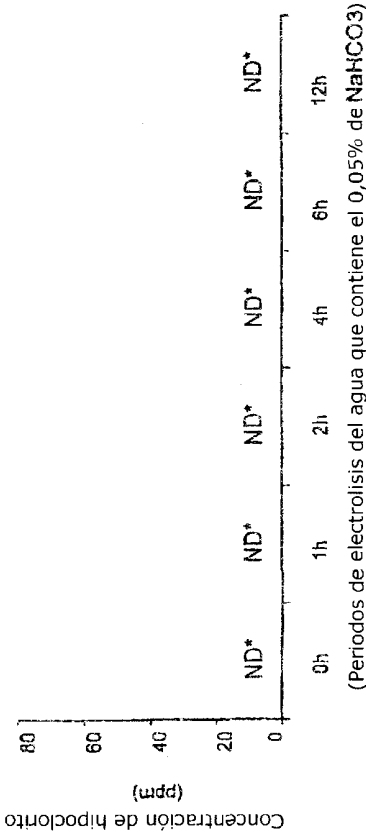
Fig 29

Concentración de hipoclorito en el agua electrolizada

A) Electrolisis de solución del 0,05% de NaCl



B) Electrolisis de solución del 0,05% de NaHCO₃

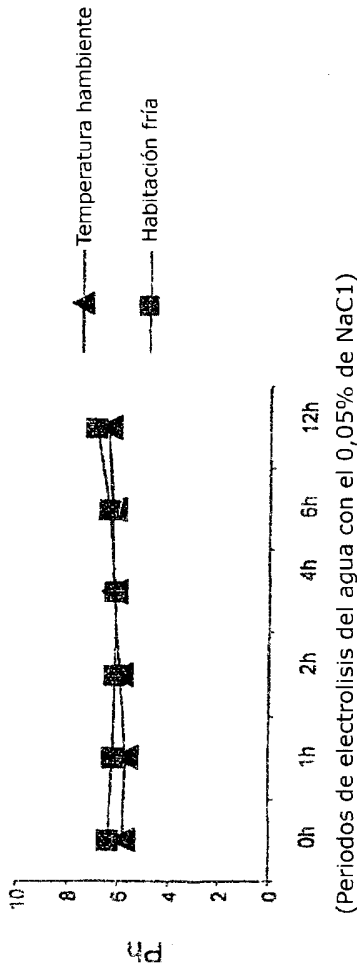


ND*: No detectable

Figura 30

Cambio de pH del agua durante la electrolisis

A) Electrolisis de una solución del 0,05% de NaCl



B) Electrolisis de una solución del 0,05% de NaHCO_3

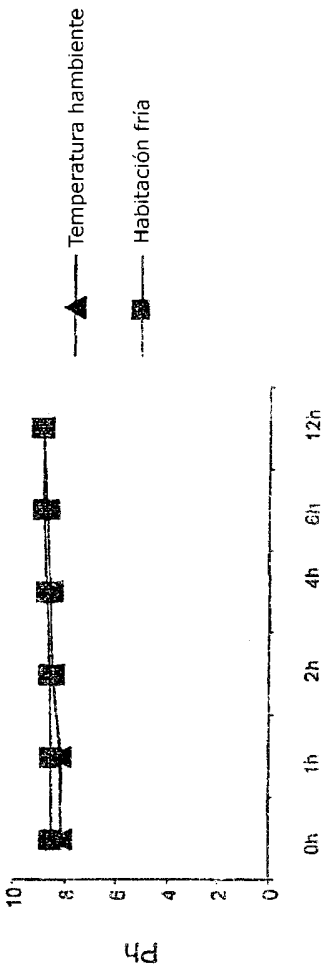


Figura 31 (Periodos de electrolisis del agua con el 0,05% de NaHCO_3)

El agua ioinzada neutra (AIN) generada mediante una electólisis de una solución del 0,05% de NaCl en habitación fría mostraba efectos antiinflamatorios sobre los macrófagos de ratón.

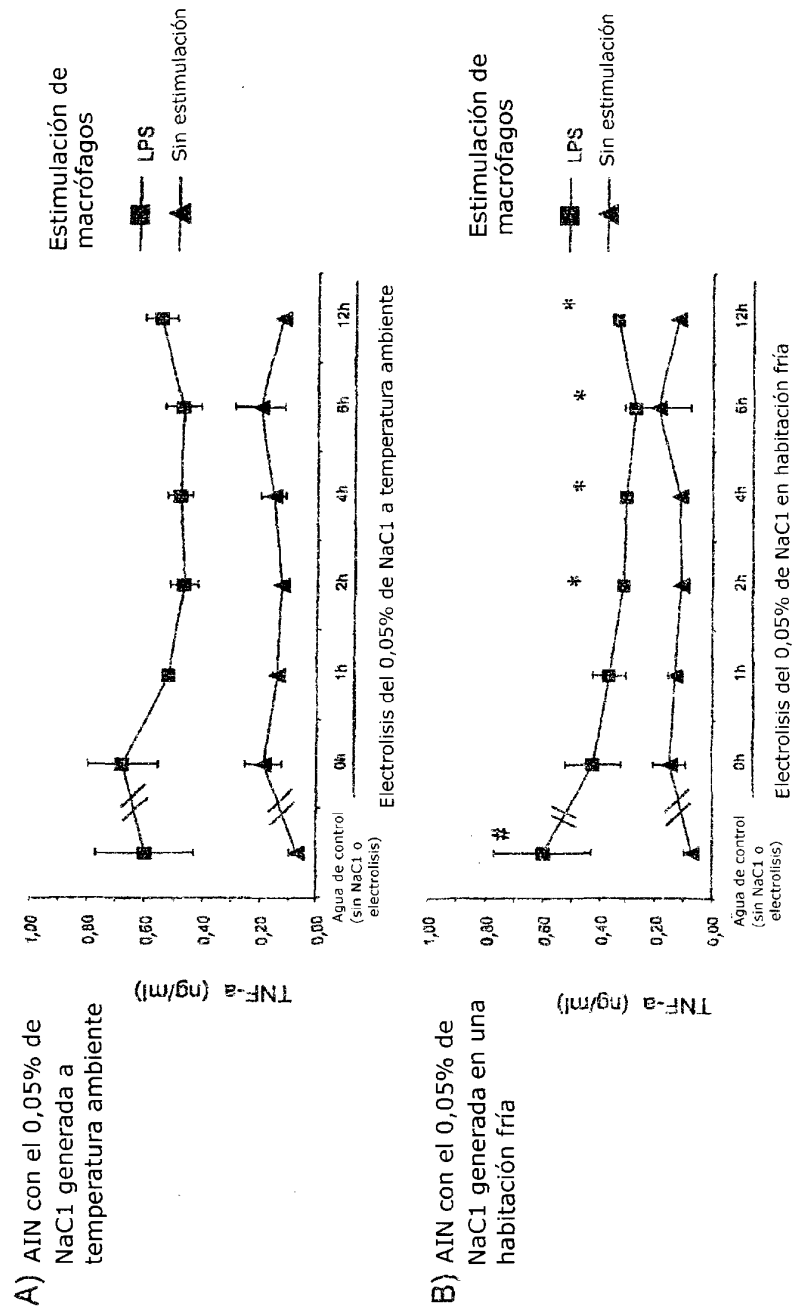


Figura 32

El agua ionizada neutra (AIN) generada mediante una electrolisis de una solución del 0,05% de NaHCO3 en habitación fría mostraba efectos antiinflamatorios sobre los macrófagos de ratón.

