



Información Científica para Profesionales de la Salud

Novavit™* - Un Complejo Biocéutico Regenerativo

Mark J. Neveu, Ph.D. Chief Scientific Officer

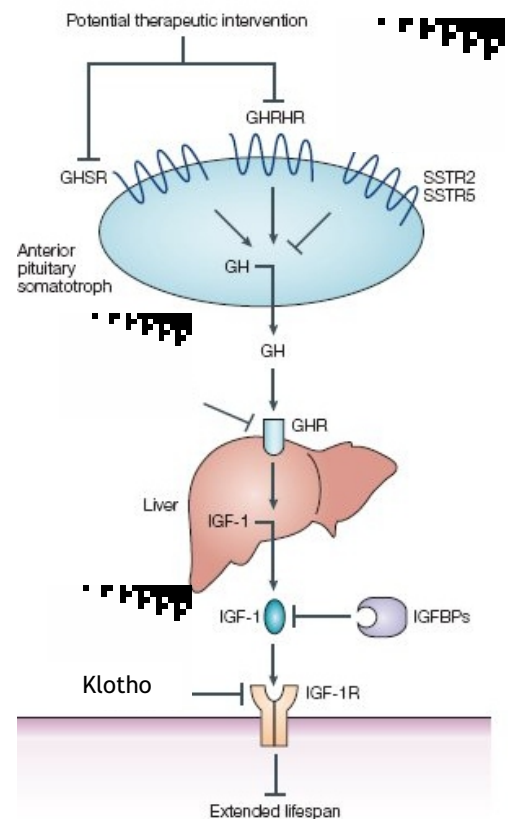
Células Madres - El Futuro de la Medicina Regenerativa

Las brechas científicas recientemente superadas que permitieron la clonación de mamíferos a partir de células diferenciadas, han refutado el viejo dogma que el desarrollo es un proceso irreversible. La ciencia moderna ha demostrado que el ADN en un núcleo adulto puede ser reprogramado a un estado embrionario que puede dirigir el desarrollo completo de un nuevo organismo (1). Factores reguladores específicos en células madres, realzan la capacidad regeneradora introduciendo la diferenciación celular de células adultas (2). La activación de estas células madres en estado latente en tejidos adultos, desde los anfibios hasta los humanos, proporciona un suministro de células para el mantenimiento continuo y reparación del organismo después del nacimiento (3).

El último objetivo de la medicina regenerativa es extender la longevidad y la calidad de vida. Los estudios realizados en una variedad de especies, demuestran que la restricción calórica es el cambio de estilo de vida más efectivo para extender la vida. Recientemente han sido identificados numerosos genes que pueden aumentar o reducir la longevidad (4,5). El desafío para el campo de la medicina anti-envejecimiento es identificar métodos que permitan modular la actividad de los puntos moleculares más importantes para aumentar la longevidad. Novavit Complex, representa un acercamiento holístico innovativo a la biotecnología usando células embrionarias que ejemplifican la máxima de Hipócrates “Que el alimento sea tu medicina y que tu medicina sea tu alimento”.

Terapia de Hormona de Crecimiento ¿El Metodo Equivocado?

La decadencia bien documentada de los niveles de la hormona del crecimiento (GH) durante el proceso de envejecimiento (somatopausia), ha causado la popularidad de la Terapia de Reemplazo Hormonal en clínicas de anti-envejecimiento. En general los estudios clínicos de la terapia de la hormona de crecimiento (GH) en pacientes con esta deficiencia, demuestran como principales beneficios el incremento de la masa muscular y de la densidad mineral ósea (6,7). A pesar de estos beneficios en la calidad de vida, numerosos estudios indican que la hormona de crecimiento (GH) realmente disminuye la longevidad en animales y personas centenarias (8,9). Por ejemplo, el tratamiento durante un periodo largo en ratas obesas con GH redujo su vida útil (10). La ausencia de GH durante la vida en otros ratones, resultó en un aumento de un 20 -70% del tiempo de vida, que no se pudiera haber extendido más allá por la restricción calórica (11,12). Los ratones deficientes de la hormona de crecimiento (GH) mostraron aumento en la sensibilidad a la insulina y la homeostasis de la glucosa que promueve la longevidad (13,14). La reducción de la hormona de crecimiento (GH) en los ratones envejecidos ha mostrado reducir la enfermedad neoplásica relacionada con la patología de la edad y aumentar la calidad de vida (15). Además, una mutación en el factor de transcripción Pit-1, disminuye los niveles de la hormona de crecimiento (GH) y aumenta la resistencia al stress oxidativo prolongando la vida en los ratones (16,17). En conjunto, los estudios indican que la terapia de la hormona de crecimiento (GH) puede tener un efecto negativo en la vida en los humanos y que la Terapia de Reemplazo Hormonal no debería sobrepasar la edad relativa del rango referencial.



* Novavit Complex y Oralcell Complex son el mismo producto, con distinto nombre por razones de registro de marca en algunos países.

Factor De Crecimiento Insulinico- Klotho, camino de Longevidad

El bloqueo del factor de crecimiento insulínico IGF1 ha sido señalado desde los micro- organismos en evolución hasta los humanos, como la clave para regular la calidad de vida (18). En contraste con los efectos negativos de la hormona de crecimiento (GH) en la longevidad, se ha identificado recientemente que varios genes del IGF1 extienden la calidad de vida de los ratones. Las funciones comunes de estos genes relacionados a sus efectos sobre la restricción calórica, controlan la sensibilidad de la insulina y la regulación de resistencia al stress oxidativo (19). La inhibición selectiva del IGF1 señalan el camino que representará una brecha en la medicina de anti-envejecimiento.

Estudios recientes han identificado una hormona peptida llamada Klotho que realza la longevidad bloqueando a ambos, marcando el IGF1 e inhibiendo los niveles de la hormona de crecimiento (GH)(20). La ausencia del gen Klotho en los ratones causa envejecimiento prematuro que aumenta las enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, atrofia de la piel, efisema pulmonar, función inmunológica y daño cognitivo (21-25). Además, polimorfismos en el gen humano Klotho están asociados a una disminución de la vida útil (26).

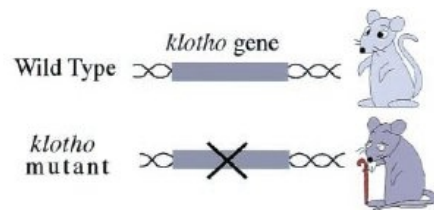


Fig. 1. A mutant model mouse is useful for studies of aging. The *klotho* phenotype (premature aging) is caused by a disruption of the single gene, *klotho*.

Se ha encontrado, que incrementando la expresión Klotho se extiende la vida útil de los ratones, inhibiendo la señalización de insulina y del IGF-1. La hormona Klotho ha demostrado que incrementa la expresión de magnesio super óxido dismutasa y que se transforma facilitando el retiro de especies reactivas oxidativas y confiere resistencia al stress oxidativo (27).

Células Madres Programadas para Longevidad Ilimitada - Una Fábrica para Biomoléculas Antienvejecimiento

En contraste con las células adultas que utilizan la Hormona de Crecimiento (GH) como estimulante, las células madres requieren Klotho, factor inhibidor de leucemia, cripto y muchos otros factores de crecimiento embrionario (28,29). Los estudios Proteómicos han identificado muchos factores de crecimiento únicos y proteínas de la matriz que específicamente regulan el crecimiento, metabolismo y señales de transferencia de células madres embrionarias (30,31), por ejemplo, cripto o TDGF1, que es un factor autocrino de crecimiento de la células madres, que es requerido para la embriogenesis, estimulando la proliferación de las células madres a cargo de la diferenciación (32).

Estudios recientes han encontrado que las células madres pluripotenciales requieren un grupo de genes que no están expresados en otro tipo de células (33-35). Un subconjunto común de al menos 92 genes reguladores, evolutivamente conservados (p.ej.: nanog, octubre 4, sox-2) proporcionan una identidad molecular única responsable de la capacidad pluripotencial de células madres de aves, ratones y humanas (36,37). La expresión de estos genes junto con la ausencia de marcadores de diferenciación, constituye un perfil de identidad de células madres no diferenciadas, independientes de su especie de origen (38) (40-44). Estos genes están relacionados con la matriz extracelular, la apoptosis, el metabolismo y otras funciones celulares y se manifiestan en células madres de aves, murine y humanas.

Por ejemplo, una patente reciente revelo que fosfolípidos aislados a partir de embriones de ave de 6-14 días aumentaron la vida útil de ratones. Cambios en la composición de los fosfolípidos de extractos de pollo y pato que contienen grupos alkenyl y grupos acyl, no se presentan típicamente en las etapas tardías de desarrollo y se encontro que extendieron la vida de ratones y revirtieron disfunciones severas relacionadas a la edad, en seres humanos entre las edades de 47 a 70 años. (39-43). Células madres pluripotenciales también han sido encontradas para expresar proteoglycanos con modificaciones glicoproteicas específicas (44-47). Por ejemplo el condroitin sulfato y dermatan sulfato, en embriones de pollos en estado inicial de desarrollo, manifiestan modificaciones únicas del proteoglicano que no se presentan en las últimas etapas del desarrollo (48) así, ningún gen individual es responsable del estado indiferenciado de las células madres, mejor dicho, las células madres están compuestas de cientos a miles de moléculas bioactivas únicas que pueden efectuar la función del organismo adulto.

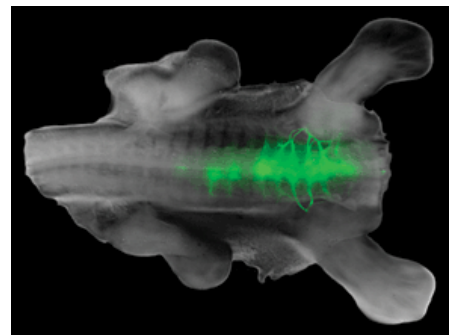


Senescencia y Stress Oxidativo - Revertido por Biomoléculas de Células Madres

Recientes estudios han mostrado que el envejecimiento resulta de la senescencia de fibroblastos que inducen alteraciones en el proceso del stress oxidativo y en los mecanismos de reparación de tejidos. (p.ej: matriz metaloproteasa), llevando a la pérdida de la función y de la organización de los tejidos, que es una característica del envejecimiento (49,50). Se ha mostrado que el aumento de la senectud fibroplástica puede ser restaurado mediante una exposición pasajera a un extracto de células embrionarias (51). El klotho es un factor de mantenimiento de células madres pluripotenciales que ha mostrado prevenir la apoptosis y la senectud de las células diferenciadas (52-54). Estudios recientes muestran que los extractos de células embrionarias reprograman células diferenciadas en células madres multipotenciales o pluripotenciales (55-57). También ha sido identificado un factor soluble que provoca el reingreso del ciclo celular en células de músculo diferenciadas (58).

Las Células Madres son Conservadas entre Especies!!!

A pesar de las diferencias genéticas entre patos y humanos (59), extensas investigaciones usando embriones de aves, demuestran que la función biológica de los factores reguladores claves para el desarrollo embrionario son evolutivamente conservados. Por ejemplo, un reciente estudio encontró que cuando células madres hematopoyéticas humanas (HSC) provenientes de la médula ósea de adultos, fueron implantadas en lesiones de la espina dorsal de un embrión en desarrollo de pollito, los factores presentes en el micro ambiente del pollito (factores de crecimiento, matriz) pudieron estimular las HSC de humanos adultos para que se diferenciaron en neuronas maduras (60). Además, otros estudios han demostrado que las células madres embrionarias humanas (ES), células madres mesenquimáticas de rata y células madres neurológicas de ratones (células verdes en el cuadro) pueden todas integrarse dentro del embrión de pollo y diferenciarse en varios tipos de células (61-63). En adición, los factores de crecimiento de aves pueden directamente estimular el crecimiento de células madres de ratón en un cultivo celular (64). Las células madres embrionarias en aves no expresan GH, pero expresan el klotho codificado de genes aviares (65). La carencia de especificidad de especie para los factores morfogénicos está demostrada por observaciones de que los factores solubles provenientes del newt pueden restaurar la capacidad regenerativa endógena de las células mamíferas diferenciadas (66,67).



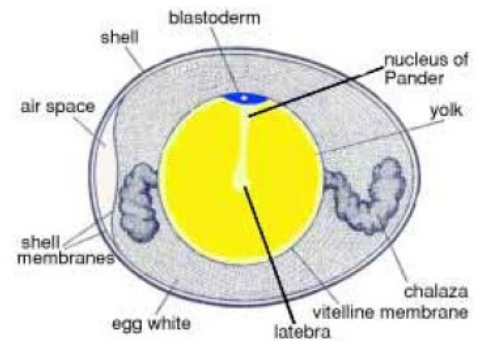
Biología de las Células Madres - Cambios Inducidos por la Cultura Celular

La Terapia Celular es uno de los campos más interesantes en la medicina de translación. Esta se basa en la intersección de una variedad de disciplinas científicas rápidamente desarrolladas: Biología de células madres, inmunología, ingeniería de tejidos, biología molecular, medicina regenerativa e investigación clínica. Aunque las terapias individuales de recombinar proteínas han sido desarrolladas para tratar enfermedades específicas (p.ej: insulina, eritropoyetina), los procesos de enfermedades más comunes no son debido a una deficiencia en una sola proteína, sino que se desarrollan debido a alteraciones en las interacciones complejas de una variedad de componentes celulares. Mientras las terapias de células madres humanas usan células vivas para un acercamiento prometedor, las pautas éticas- reguladoras corrientes y las cuestiones de seguridad-eficacia potenciales no permiten el uso de células madres humanas en los EE. UU.

Los extractos de células madres representan una solución alternativa de entregar una multitud de factores reguladores del crecimiento para promover la longevidad. Los extractos de células madres podrían ser sacados de embriones liofilizados o de las líneas de células propagadas en cultivos celulares. Los genes embrionarios tienen distinción específica y perfil de expresión temporal, indicando que las células madres cosechadas en tiempos diferentes del desarrollo tendrán diferentes biomoléculas (68). Un estudio reciente de células madres no cultivadas purificadas encontró significativas alteraciones en la expresión de genes después de un cultivo de células in vitro. En el cultivo celular, las transcripciones asociadas con el ciclo de la célula, la falta de soporte, ciertas citocinas y genes específicos en órganos, fueron regulados a un bajo nivel mientras que transcripciones asociadas con la señal de transducción, la adherencia de células y las proteínas citosqueléticas, fueron reguladas a un nivel más alto (60). Estos cambios resultan como consecuencia de la propagación de la célula in vitro en una superficie plástica con factores de crecimiento inadecuados que no imitan el micro ambiente del embrión. Así, tejidos embrionarios frescos liofilizados en tiempos específicos de embriogénesis son requeridos para producir extractos que representen el auténtico perfil de biomoléculas de células madres.



Novavit El objetivo de Novavit fue crear el primer auténtico bioceutico embrionario celular. Los científicos y los ingenieros en Novavit tenían que hacer lo imposible, porque el número de células madres son muy limitadas en cualquier organismo en desarrollo ya que todo se inicia en el mismo lugar - un espermatozoido y un ovocito. Las células de ave fueron elegidas como la fuente óptima debido a la capacidad de micro liofilizar células blastodermicas de millones de huevos para crear una auténtica célula madre bioceutica. Cada frasco de Novavit (corresponde a la dosis diaria) contiene células madres blastodermicas micro liofilizadas de una gran cantidad de huevos, utilizando un procesamiento propio.



Mientras los huevos de pollo habrían sido más fáciles de obtener, Novavit decidió usar huevos de Pato Pekín criados en granjas, que siguen los procedimientos aprobados del USDA. Los métodos de propagación usados para producir pollos comerciales en jaula encajonados incluyen muchas hormonas y vacunaciones que cambian considerablemente la bioquímica de los huevos y de la carne de pollo (69,70). En contraste del pollo de criadero, los Patos Pekín usados para crear Novavit no son vacunados. El extracto es liofilizado usando un proceso patentado y el producto ha sido certificado por un laboratorio independiente libre de Salmonela, E. coli y otros contaminantes biológicos potenciales.



Blastocito de Pato

El período de gestación para el desarrollo del patito toma 27-28 días después de la fertilización. Es interesante comentar que en varios países asiáticos los embriones de patos vivos cosechados entre 16-18 días representan un estímulo de salud común llamado Balut (Filipinas), Huevos Embrionados (China), o Lon Vit caliente (vietnamita). El Balut no sería demasiado apetecible para la mayor parte de los americanos porque al día 16-18 los embriones han producido ya huesos y plumas. Las células madres en Novavit son muy diferentes de las del Balut, las células madres Pluripotenciales son micro liofilizadas a partir de los blastocistos de patos y embriones prematuros cosechados en un tiempo específico menor a un día posterior a la fertilización. Los estudios muestran

que estas células madres son capaces de proliferarse y auto-renovarse y tienen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos de células somáticas (71). En forma similar a las células madres humanas las células madres embrionarias de ave, emplean la telomerasa para soportar rondas múltiples de división celular y esto diferencia las células de ave de una baja regulación de la expresión telomerasa coincidente con la organogénesis y la diferenciación somática (72).

Actividad de Extractos de Célula - Cientos de Estudios de Investigación

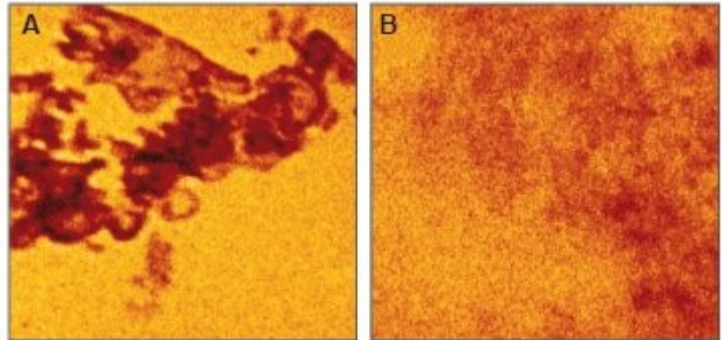
La actividad biológica de una variedad de extractos de tejido ha sido demostrada en cientos de estudios en humanos y modelos de animales enfermos. Por ejemplo, Thymus oral de bovino ha demostrado ejercer acciones correctivas en ratones y perros en desórdenes relacionados con la edad (73). La ventaja clínica del uso oral de extractos de Bazo, ha sido demostrada en úlceras gastroduodenales (74). Los péptidos embrionarios han demostrado bajar factores de riesgo cardíacos incluso el colesterol LDL, apolipoproteínas A/B, y los niveles de insulina en 40 sujetos envejecidos entre 50-75 años (75). Cientos de estudios de investigación han documentado la actividad biológica de extractos de tejido de animal del Bazo, Hígado, y Glándula Suprarrenal (76-78) Solcoseryl es un extracto obtenido de la sangre de ternero que es extensamente usada fuera de los Estados Unidos para una variedad de condiciones de salud (79). Un extracto lípido del total de la placenta humana, que contiene esfingolípidos, ha demostrado estimular la melanogénesis y la pigmentación en ratones (80,81). Un pequeño péptido ha sido purificado del extracto de Placenta con homología en la fibronectina tipo III, que tiene actividad curativa en una herida (81). El extracto de Placenta de cerdo ha sido encontrado para modular la inmunidad en el ratón y linfocitos humanos (82). Un extracto de célula fetal humana fue encontrado para inhibir la formación de micro núcleo inducida por factores cancerígenos indicativos existentes en extractos fetales que exhiben efectos anti-mutagénicos (83)



Novavit Complex - Realzando la Biolavilidad del Extracto de Células Madres

Novavit Complex ha sido creado usando una forma patentada de un polielectrólito orgánico (es decir montmorillonite) que contiene niveles altos de ácido húmico y ácido fúlvico. Este material natural ha demostrado tener propiedades únicas que protegerán el extracto de células madres de la degradación gastrointestinal y facilitan el consumo de biomoléculas activas en el intestino delgado. Los estudios de seguridad han demostrado que la arcilla montmorillonita (3gms/día) no induce ningún cambio hematológico en el hígado y función del riñón (84).

Un estudio publicado en la revista *Science*, demostró que el ácido fúlvico forma estructuras macromoleculares (es decir rollos, Figura A) con pH bajo que se dispersan (Figura B) en el pH alto (85). Las estructuras macromoleculares protegen las moléculas ligadas de las proteolíticas y del daño del ácido en el estómago. La composición de las proteínas montmorillonita ha mostrado exhibir un pH dependiente de interacciones hidrofóbico, hidrofílico, e interacciones electrostáticas. En el pH ácido (p.ej.: el ácido del estómago), la montmorillonita está en un estado de floculación (suspendido) y el rango de dispersión de moléculas ligadas es inhibido. Para aumentar el pH a 7 (p.ej: intestino delgado), las partículas de arcilla progresivamente decantan y el rango de liberación de las moléculas ligadas aumentan (86). El consumo celular de varias medicinas fue aumentado usando nanopartículas de montmorillonita (87). Además, se encontró que la montmorillonita proporciona un nivel más alto de la protección del ADN contra la degradación por DNAasa (88). La administración oral del complejo ADN a la montmorillonita provee la protección al ambiente ácido del estómago y a la degradación enzimática del ADN en el intestino y liberó exitosamente el ADN plasmático dentro de las células del intestino delgado de los ratones. (89).



PARA MAYORES ANTECEDENTES SOBRE LOS NUMEROSOS COMPONENTES BIOACTIVOS DE NOVAVIT COMPLEX Y/O ORALCELL COMPLEX, POR FAVOR CONSULTELO AL SIGUIENTE CORREO: info@novavitcomplex.com

Declaración: El contenido de este informe no ha sido evaluado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y su propósito es exclusivamente educacional. Ninguno de estas antecedentes deben ser interpretadas como una declaración de que este producto intenta curar, diagnosticar, sanar o prevenir cualquier enfermedad. Ciertas personas consideradas expertas podrían no estar de acuerdo con una o más de las opiniones expresadas en este informe. Sin embargo estas declaraciones tienen bases creíbles y sus fuentes una autoridad reconocida en la materia.

Referencias:

1. Hochedlinger, K. and Jaenisch, R. (2006) Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 441, 1061-1067.
2. Odelberg, S.J. (2002) Inducing cellular dedifferentiation: a potential method for enhancing endogenous regeneration in mammals. *Seminars in cell & developmental biology*, 13, 335-343.
3. Young, H.E. (2004) Existence of reserve quiescent stem cells in adults, from amphibians to humans. *Current topics in microbiology and immunology*, 280, 71-109.
4. de Magalhaes, J.P., Cabral, J.A. and Magalhaes, D. (2005) The influence of genes on the aging process of mice: a statistical assessment of the genetics of aging. *Genetics*, 169, 265-274.
5. Curtis, R., Geesaman, B.J. and DiStefano, P.S. (2005) Ageing and metabolism: drug discovery opportunities. *Nature reviews*, 4, 569-580.
6. Boguszewski, C.L., Meister, L.H., Zaninelli, D.C. and Radominski, R.B. (2005) One year of GH replacement therapy with a fixed low-dose regimen improves body composition, bone mineral density and lipid profile of GH-deficient adults. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 152, 67-75.
7. Woodhouse, L.J., Mukherjee, A., Shalet, S.M. and Ezzat, S. (2006) The influence of growth hormone status on physical impairments, functional limitations, and health-related quality of life in adults. *Endocrine reviews*, 27, 287-317.
8. Barbieri, M., Rizzo, M.R., Manzella, D., Grella, R., Ragno, E., Carbonella, M., Abbatecola, A.M. and Paolisso, G. (2003) Glucose regulation and oxidative stress in healthy centenarians. *Experimental gerontology*, 38, 137-143.
9. Franceschi, C., Olivieri, F., Marchegiani, F., Cardelli, M., Cavallone, L., Capri, M., Salvioli, S., Valensin, S., De Benedictis, G., Di Iorio, A. *et al.* (2005) Genes involved in immune response/inflammation, IGF1/insulin pathway



10. Azain, M.J., Broderson, J.R. and Martin, R.J. (2006) Effect of long-term somatotropin treatment on body composition and life span in aging obese Zucker rats. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)*, 231, 76-83.
11. Bartke, A. (2005) Minireview: role of the growth hormone/insulin-like growth factor system in mammalian aging. *Endocrinology*, 146, 3718-3723.
12. Bonkowski, M.S., Rocha, J.S., Masternak, M.M., Al Regaiey, K.A. and Bartke, A. (2006) Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7901-7905.
13. Liu, J.L., Coschigano, K.T., Robertson, K., Lipsett, M., Guo, Y., Kopchick, J.J., Kumar, U. and Liu, Y.L. (2004) Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *American journal of physiology*, 287, E405-413.
14. Al-Regaiey, K.A., Masternak, M.M., Bonkowski, M., Sun, L. and Bartke, A. (2005) Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor I/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology*, 146, 851-860.
15. Sonntag, W.E., Carter, C.S., Ikeno, Y., Ekenstedt, K., Carlson, C.S., Loeser, R.F., Chakrabarty, S., Lee, S., Bennett, C., Ingram, R. *et al.* (2005) Adult-onset growth hormone and insulin-like growth factor I deficiency reduces neoplastic disease, modifies age-related pathology, and increases life span. *Endocrinology*, 146, 2920-2932.
16. Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R.A. and Harrison, D.E. (2001) Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 6736-6741.
17. Madsen, M.A., Hsieh, C.C., Boylston, W.H., Flurkey, K., Harrison, D. and Papaconstantinou, J. (2004) Altered oxidative stress response of the long-lived Snell dwarf mouse. *Biochemical and biophysical research communications*, 318, 998-1005.
18. Cheng, C.L., Gao, T.Q., Wang, Z. and Li, D.D. (2005) Role of insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway in longevity. *World J Gastroenterol*, 11, 1891-1895.
19. Lopez-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M.V., Allard, J., Ingram, D.K., Navas, P. *et al.* (2006) Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1768-1773.
20. Kashimada, K., Yamashita, T., Tsuji, K., Nifuji, A., Mizutani, S., Nabeshima, Y. and Noda, M. (2002) Defects in growth and bone metabolism in klotho mutant mice are resistant to GH treatment. *The Journal of endocrinology*, 174, 403-410.
21. Kurosu, H., Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J.V., Nandi, A., Gurnani, P., McGuinness, O.P., Chikuda, H., Yamaguchi, M., Kawaguchi, H. *et al.* (2005) Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*, 309, 1829-1833.
22. Nagai, T., Yamada, K., Kim, H.C., Kim, Y.S., Noda, Y., Imura, A., Nabeshima, Y. and Nabeshima, T. (2003) Cognition impairment in the genetic model of aging klotho gene mutant mice: a role of oxidative stress. *Faseb J*, 17, 50-52.
23. Okada, S., Yoshida, T., Hong, Z., Ishii, G., Hatano, M., Kuro, O.M., Nabeshima, Y., Nabeshima, Y. and Tokuhisa, T. (2000) Impairment of B lymphopoiesis in precocious aging (klotho) mice. *International immunology*, 12, 861-871.
24. Saito, Y., Yamagishi, T., Nakamura, T., Ohyama, Y., Aizawa, H., Suga, T., Matsumura, Y., Masuda, H., Kurabayashi, M., Kuro-o, M. *et al.* (1998) Klotho protein protects against endothelial dysfunction. *Biochemical and biophysical research communications*, 248, 324-329.
25. Takeshita, K., Fujimori, T., Kurotaki, Y., Honjo, H., Tsujikawa, H., Yasui, K., Lee, J.K., Kamiya, K., Kitaichi, K., Yamamoto, K. *et al.* (2004) Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression. *Circulation*, 109, 1776-1782.
26. Arking, D.E., Atzmon, G., Arking, A., Barzilai, N. and Dietz, H.C. (2005) Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circulation research*, 96, 412-418.
27. Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J.V., Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., Miyoshi, M., Ogawa, Y., Castrillon, D.H., Rosenblatt, K.P. *et al.* (2005) Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *The Journal of biological chemistry*, 280, 38029-38034.
28. Burnside, J. and Cogburn, L.A. (1992) Developmental expression of hepatic growth hormone receptor and insulin-like growth factor-I mRNA in the chicken. *Molecular and cellular endocrinology*, 89, 91-96.
29. Horiuchi, H., Tategaki, A., Yamashita, Y., Hisamatsu, H., Ogawa, M., Noguchi, T., Aosasa, M., Kawashima, T., Akita, S., Nishimichi, N. *et al.* (2004) Chicken leukemia inhibitory factor maintains chicken embryonic stem cells in the undifferentiated state. *The Journal of biological chemistry*, 279, 24514-24520.
30. Baharvand, H., Hajheidari, M., Ashtiani, S.K. and Salekdeh, G.H. (2006) Proteomic signature of human embryonic stem cells. *Proteomics*, 6, 3544-3549.
31. Prudhomme, W., Daley, G.Q., Zandstra, P. and Lauffenburger, D.A. (2004) Multivariate proteomic analysis of murine embryonic stem cell self-renewal versus differentiation signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2900-2905.
32. Xu, C., Liguori, G., Persico, M.G. and Adamson, E.D. (1999) Abrogation of the Cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes. *Development (Cambridge, England)*, 126, 483-494.

33. Sharov, A.A., Piao, Y., Matoba, R., Dudekula, D.B., Qian, Y., VanBuren, V., Falco, G., Martin, P.R., Stagg, C.A., Bassey, U.C. *et al.* (2003) Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. *PLoS biology*, 1, E74.
34. Tanaka, T.S., Kunath, T., Kimber, W.L., Jaradat, S.A., Stagg, C.A., Usuda, M., Yokota, T., Niwa, H., Rossant, J. and Ko, M.S. (2002) Gene expression profiling of embryo-derived stem cells reveals candidate genes associated with pluripotency and lineage specificity. *Genome research* 12, 1921-1928.
35. Golan-Mashiach, M., Dazard, J.E., Gerecht-Nir, S., Amariglio, N., Fisher, T., Jacob-Hirsch, J., Bielora, B., Osenberg, S., Barad, O., Getz, G. *et al.* (2005) Design principle of gene expression used by human stem cells: implication for pluripotency. *Faseb J*, 19, 147-149.
36. Acloque, H., Mey, A., Birot, A.M., Gruffat, H., Pain, B. and Samarut, J. (2004) Transcription factor cCP2 controls gene expression in chicken embryonic stem cells. *Nucleic acids research* 32, 2259-2271.
37. Bhattacharya, B., Miura, T., Brandenberger, R., Mejido, J., Luo, Y., Yang, A.X., Joshi, B.H., Ginis, I., Thies, R.S., Amit, M. *et al.* (2004) Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood*, 103, 2956-2964.
38. Franco-Molina, M.A., Mendoza-Gamboa, E., Castillo-Leon, L., Tamez-Guerra, R.S. and Rodriguez-Padilla, C. (2005) Bovine dialyzable leukocyte extract modulates the nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated murine peritoneal macrophages in vitro. *Journal of medicinal food*, 8, 20-26.
39. Kang, D.S. and Kang, K. (2006) patent no. 7,003,612.
40. Helmy, F.M. (2004) Comparative studies of the endogenous phospholipids and their in vitro hydrolysis by endogenous phospholipases of various tissues from 7-day-old chicks: a thin layer chromatographic and densitometric analysis. *Cell biochemistry and function*, 22, 389-398.
41. Gavrilova, N.J., Setchenska, M.S. and Petkova, D.H. (1995) Alteration in liver plasma membrane phospholipids and protein kinase activities during the development of chick embryo. *Comparative biochemistry and physiology*, 111, 463-469.
42. Neel, D., Bernard, B., Aubery, M. and Bourrillon, R. (1981) Changes in phospholipids from chick fibroblasts during embryo development. *Biochemical and biophysical research communications* 98, 21-27.
43. Gonzalez-Ros, J.M. and Ribera, A. (1980) Molecular species composition of phosphatidylcholines during the development of the avian embryo brain. *Lipids*, 15, 279-284.
44. Cooper, S., Bennett, W., Andrade, J., Reubinoff, B.E., Thomson, J. and Pera, M.F. (2002) Biochemical properties of a keratan sulphate/chondroitin sulphate proteoglycan expressed in primate pluripotent stem cells. *Journal of anatomy*, 200, 259-265.
45. Streit, A., Yuen, C.T., Loveless, R.W., Lawson, A.M., Finne, J., Schmitz, B., Feizi, T. and Stern, C.D. (1996) The Le(x) carbohydrate sequence is recognized by antibody to L5, a functional antigen in early neural development. *Journal of neurochemistry*, 66, 834-844.
46. Jirmanova, L., Pacholikova, J., Krejci, P., Hampl, A. and Dvorak, P. (1999) O-linked carbohydrates are required for FGF-2-mediated proliferation of mouse embryonic cells. *The International journal of developmental biology*, 43, 555-562.
47. Muramatsu, T. and Muramatsu, H. (2004) Carbohydrate antigens expressed on stem cells and early embryonic cells. *Glycoconjugate journal*, 21, 41-45.
48. Skandalis, S.S., Theocharis, A.D., Papageorgakopoulou, N. and Zagris, N. (2003) Glycosaminoglycans in early chick embryo. *The International journal of developmental biology*, 47, 311-314.
49. Parrinello, S., Coppe, J.P., Krtolica, A. and Campisi, J. (2005) Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *Journal of cell science*, 118, 485-496.
50. Yudoh, K., Nguyen, T., Nakamura, H., Hongo-Masuko, K., Kato, T. and Nishioka, K. (2005) Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis research & therapy*, 7, R380-391.
51. Amtmann, E., Edde, E., Sauer, G. and Westphal, O. (1990) Restoration of the responsiveness to growth factors in senescent cells by an embryonic cell extract. *Experimental cell research*, 189, 202-207.
52. Ikushima, M., Rakugi, H., Ishikawa, K., Maekawa, Y., Yamamoto, K., Ohta, J., Chihara, Y., Kida, I. and Ogihara, T. (2006) Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 339, 827-832.
53. Hamdi, H.K. and Castellon, R. (2004) A genetic variant of ACE increases cell survival: a new paradigm for biology and disease. *Biochemical and biophysical research communications* 318, 187-191.
54. Benvenuti, S., Cramer, R., Quinn, C.C., Bruce, J., Zvelebil, M., Corless, S., Bond, J., Yang, A., Hockfield, S., Burlingame, A.L. *et al.* (2002) Differential proteome analysis of replicative senescence in rat embryo fibroblasts. *Mol Cell Proteomics*, 1, 280-292.
55. Collas, P., Taranger, C.K., Boquest, A.C., Noer, A. and Dahl, J.A. (2006) On the way to reprogramming cells to pluripotency using cell-free extracts. *Reproductive biomedicine online*, 12, 762-770.
56. Hakelien, A.M., Gaustad, K.G. and Collas, P. (2006) Modulation of cell fate using nuclear and cytoplasmic extracts. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 325, 99-114.
57. Taranger, C.K., Noer, A., Sorensen, A.L., Hakelien, A.M., Boquest, A.C. and Collas, P. (2005) Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Molecular biology of the cell*, 16, 5719-5735.
58. Straube, W.L., Brockes, J.P., Drechsel, D.N. and Tanaka, E.M. (2004) Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration: partial purification of a serum factor that triggers cell cycle re-entry in differentiated muscle cells. *Cloning and stem cells* 6, 333-344.
59. Burt, D.W. (2005) Chicken genome: current status and future opportunities. *Genome research* 15, 1692-1698.

60. Boquest, A.C., Shahdadfar, A., Fronsdal, K., Sigurjonsson, O., Tunheim, S.H., Collas, P. and Brinchmann, J.E. (2005) Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Molecular biology of the cell*, 16, 1131-1141.
61. Goldstein, R.S., Drukker, M., Reubinoff, B.E. and Benvenisty, N. (2002) Integration and differentiation of human embryonic stem cells transplanted to the chick embryo. *Dev Dyn*, 225, 80-86.
62. Pochampally, R.R., Neville, B.T., Schwarz, E.J., Li, M.M. and Prockop, D.J. (2004) Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 9282-9285.
63. Clarke, D.L., Johansson, C.B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U. and Frisen, J. (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*, 288, 1660-1663.
64. Yang, Z. and Petite, J.N. (1994) Use of avian cytokines in mammalian embryonic stem cell culture. *Poultry science*, 73, 965-974.
65. Avian Kloths XM_423224 and XM_417105.
66. Odelberg, S.J. (2005) Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anatomical record*, 287, 25-35.
67. McGann, C.J., Odelberg, S.J. and Keating, M.T. (2001) Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 13699-13704.
68. Chapman, S.C., Schubert, F.R., Schoenwolf, G.C. and Lumsden, A. (2002) Analysis of spatial and temporal gene expression patterns in blastula and gastrula stage chick embryos. *Developmental biology*, 245, 187-199.
69. Berg, C. (2001) Health and welfare in organic poultry production. *Acta veterinaria Scandinavica*, 95, 37-45.
70. Hester, P.Y. (2005) Impact of science and management on the welfare of egg laying strains of hens. *Poultry science*, 84, 687-696.
71. Petite, J.N., Liu, G. and Yang, Z. (2004) Avian pluripotent stem cells. *Mechanisms of development*, 121, 1159-1168.
72. Swanberg, S.E., Payne, W.S., Hunt, H.D., Dodgson, J.B. and Delany, M.E. (2004) Telomerase activity and differential expression of telomerase genes and c-myc in chicken cells in vitro. *Dev Dyn*, 231, 14-21.
73. Basso, A., Rossolini, G., Piantanelli, A., Amici, D., Calzuola, I., Mancinelli, L., Marsili, V. and Gianfranceschi, G.L. (2005) Aging reversibility: from thymus graft to vegetable extract treatment-- application to cure an age-associated pathology. *Biogerontology*, 6, 245-253.
74. Shumakov, V.I., Vasilchenkov, A.V., Tsybin, A.B., Gorshenin, T.L. and Grankin, V.I. (2005) Natural cytokines: new potentialities of immunotherapy of gastroduodenal ulcer. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 140, 61-65.
75. Mihaescu, G., Olinescu, R. and Oancea, F. (2005) Significant modification of lipid metabolism in aged persons following the treatment with a nutritive supplement containing embryonary peptides--preliminary results. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne*, 43, 133-139.
76. Spleen Extract <http://www.naturalstandard.com/naturalstandard/monographs/references/refs-spleenextract.asp>.
77. Liver Extract <http://www.naturalstandard.com/naturalstandard/monographs/references/refs-liverextract.asp>.
78. Adrenal Extract http://www.naturalstandard.com/naturalstandard/monographs/references/refs_adrenalextract.asp.
79. Ukraintseva, S.V., Arbeev, K.G., Michalsky, A.I. and Yashin, A.I. (2004) Antiaging treatments have been legally prescribed for approximately thirty years. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1019, 64-69.
80. Saha, B., Singh, S.K., Sarkar, C., Mallick, S., Bera, R. and Bhadra, R. (2006) Transcriptional activation of tyrosinase gene by human placental sphingolipid. *Glycoconjugate journal*, 23, 259-268.
81. Chakraborty, P.D. and Bhattacharyya, D. (2005) Isolation of fibronectin type III like peptide from human placental extract used as wound healer. *Journal of chromatography*, 818, 67-73.
82. Georgieva, R., Stefanov, D., Fichorova, R. and Dimitrova, E. (1995) Effects of the whole extract and the chromatographic fractions of the pig placenta on lymphocyte proliferation and humoral immune response. *Theriogenology*, 44, 539-551.
83. Chen, S.Q., Xue, K.X., Ma, G.J., Wu, J.Z., Wang, H., Xiang, L.P. and Cheng, N. (1994) Suppressing effects of human fetal cell extract on micronuclei induced by cyclophosphamide in mice. *Mutation research*, 310, 113-116.
84. Wang, J.S., Luo, H., Billam, M., Wang, Z., Guan, H., Tang, L., Goldston, T., Afriyie-Gyawu, E., Lovett, C., Griswold, J. et al. (2005) Short-term safety evaluation of processed calcium montmorillonite clay (NovaSil) in humans. *Food additives and contaminants*, 22, 270-279.
85. Myneni, S.C., Brown, J.T., Martinez, G.A. and Meyer-Ilse, W. (1999) Imaging of humic substance macromolecular structures in water and soils. *Science*, 286, 1335-1337.
86. Shrivastava, R., Jain, S.R. and Frank, S.G. (1985) Dissolution dialysis studies of metronidazole-montmorillonite adsorbates. *Journal of pharmaceutical sciences*, 74, 214-216.
87. Dong, Y. and Feng, S.S. (2005) Poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26, 6068-6076.
88. Cai, P., Huang, Q.Y. and Zhang, X.W. (2006) Interactions of DNA with clay minerals and soil colloidal particles and protection against degradation by DNase. *Environmental science & technology*, 40, 2971-2976.
89. Kawase, M., Hayashi, Y., Kinoshita, F., Yamato, E., Miyazaki, J., Yamakawa, J., Ishida, T., Tamura, M. and Yagi, K. (2004) Protective effect of montmorillonite on plasmid DNA in oral gene delivery into small intestine. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 27, 2049-2051.