



# Ensayo abierto y ensayo cruzado aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de agua enriquecida con hidrógeno para miopatías mitocondriales e inflamatorias

Mikako Ito<sup>1†</sup>, Tohru Ibi<sup>2†</sup>, Ko Sahashi<sup>3</sup>, masashi ichihara<sup>4</sup>, Masafumi Ito<sup>5</sup> y Kinji Ohno<sup>1\*</sup>

## Abstracto

**Antecedentes:** el hidrógeno molecular tiene efectos prominentes en más de 30 modelos animales, especialmente en enfermedades inflamatorias y enfermedades mediadas por estrés oxidativo. Además, se han informado efectos del hidrógeno en humanos en diabetes mellitus tipo 2, hemodiálisis, síndrome metabólico, radioterapia para el cáncer de hígado e infarto del tronco encefálico. Los efectos del hidrógeno se atribuyen a actividades específicas de barrido de radicales que eliminan el radical hidroxilo y el peroxinitrito, y también a las actividades de modulación de señales, pero los mecanismos moleculares detallados siguen siendo difíciles de alcanzar.

El hidrógeno es una molécula segura que es producida en gran parte por bacterias intestinales en roedores y humanos, y no se han documentado efectos adversos.

**Métodos:** Realizamos un ensayo abierto de beber 1,0 litro por día de agua enriquecida con hidrógeno durante 12 semanas en cinco pacientes con distrofia muscular progresiva (PMD), cuatro pacientes con polimiositis/dermatomiositis (PM/DM) y cinco pacientes con miopatías mitocondriales (MM), y medimos 18 parámetros séricos, así como 8-isoprostano urinario cada 4 semanas. A continuación, realizamos un ensayo cruzado, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de 0,5 litros por día de agua enriquecida con hidrógeno o agua de placebo durante 8 semanas en 10 pacientes con DM y 12 pacientes con MM, y medimos 18 parámetros séricos cada 4 semanas.

**Resultados:** En el ensayo abierto, no se observaron mejoras ni empeoramientos objetivos de los síntomas clínicos. Sin embargo, observamos efectos significativos en las proporciones de lactato a piruvato en PMD y MM, glucosa en sangre en ayunas en PMD, metaloproteinasa de matriz sérica-3 (MMP3) en PM/DM y triglicéridos séricos en PM/DM. En el ensayo doble ciego, no se observaron efectos clínicos objetivos, pero se detectó una mejora significativa en el lactato en MM. Las proporciones de lactato a piruvato en MM y MMP3 en DM también mostraron respuestas favorables pero sin significación estadística.

No se observaron efectos adversos en ninguno de los ensayos, excepto por los episodios de hipoglucemia en un paciente con MELAS tratado con insulina, que remitieron al reducir la dosis de insulina.

**Conclusiones:** El agua enriquecida con hidrógeno mejora la disfunción mitocondrial en MM y los procesos inflamatorios en PM/DM. Los efectos menos prominentes con el ensayo doble ciego en comparación con el ensayo abierto probablemente se debieron a una menor cantidad de hidrógeno administrado y un período de observación más corto, lo que implica un efecto umbral o un efecto dosis-respuesta del hidrógeno.

\* Correspondencia: ohnok@med.nagoya-u.ac.jp † Contribuyó igualmente

<sup>1</sup> División de Neurogenética, Centro de Enfermedades Neurológicas y Cáncer, Facultad de Medicina de la Universidad de Nagoya, 65 Tsurumai, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japón

La lista completa de información del autor está disponible al final del artículo.

## Antecedentes

Ohsawa y sus colegas informaron por primera vez sobre el efecto del gas hidrógeno en el infarto cerebral en junio de 2007 [1]. Se han informado los efectos del hidrógeno administrado en forma de gas inhalado, agua potable, instilación e inyección intraperitoneal para 31, 4 y 5 enfermedades en modelos animales, células y humanos, respectivamente [2]. El hidrógeno exhibe efectos prominentes, especialmente en enfermedades mediadas por estrés oxidativo y enfermedades inflamatorias en roedores. El hidrógeno elimina los radicales hidroxilo y, con menor eficacia, el peroxinitrito [1]. Sin embargo, es poco probable que las actividades de eliminación de radicales sean un mecanismo exclusivo, porque la cantidad de especies de radicales de oxígeno generadas en roedores y humanos es mucho mayor que la cantidad de moléculas de hidrógeno absorbidas por el cuerpo. De hecho, la cantidad de hidrógeno absorbida al beber agua enriquecida con hidrógeno (HEW) es 100 o más veces menor que la que se obtiene al inhalar gas hidrógeno al 2 %, pero beber HEW muestra efectos beneficiosos tan buenos o incluso mejores que inhalar gas hidrógeno al 2 % en roedores [2-4], lo que sugiere la falta de un efecto dosis-respuesta simple. Nuestro estudio anterior sobre la alergia tipo 1 también indica que el hidrógeno suprime la alergia tipo 1 al actuar como un modulador de la señal gaseosa, no como un eliminador de radicales [5].

Los efectos del hidrógeno en humanos se han examinado en cinco estudios. En primer lugar, un estudio cruzado aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de 900 ml/día de HEW durante 8 semanas en 30 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 demostró reducciones significativas del colesterol LDL modificado con carga electronegativa, las LDL pequeñas y densas y los 8-isoprostanos urinarios [6]. En segundo lugar, un ensayo abierto de solución de hemodiálisis enriquecida con hidrógeno electrolizado en 9 pacientes durante 4 meses [7] y 21 pacientes durante 6 meses [8] mostró disminuciones significativas de la presión arterial sistólica antes y después de la diálisis, así como de la proteína 1 quimioatrayente de monocitos plasmáticos y la mieloperoxidasa. En tercer lugar, un ensayo abierto de 1,5-2,0 litros por día de HEW durante 8 semanas en 20 sujetos con síndrome metabólico mostró un aumento del 39 % en la superóxido dismutasa urinaria (SOD), una disminución del 43 % en las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en la orina (TBARS), un aumento del 8 % en el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y una disminución del 13 % en la relación colesterol total/HDL-colesterol [9]. En cuarto lugar, un estudio aleatorizado controlado con placebo de 1,5-2,2 litros/día de HEW durante 6 semanas en 49 pacientes que recibieron radioterapia por tumores hepáticos malignos mostró mejoras notables en las puntuaciones de calidad de vida [10]. Como el estudio no fue cegado, las puntuaciones subjetivas de calidad de vida tendieron a sobreestimarse por un efecto placebo, pero los marcadores objetivos de estrés oxidativo también disminuyeron significativamente. Quinto, la infusión por goteo de solución salina enriquecida con hidrógeno en combinación con Edaravone, un eliminador de radicales clínicamente aprobado para el infarto de

en comparación con 24 pacientes que recibieron Edaravone solo [11]. Aunque el estudio no fue aleatorizado ni ciego, los marcadores de resonancia magnética de pacientes infundidos con hidrógeno mostraron mejoras significativas y una normalización acelerada.

Impulsados por los efectos prominentes del hidrógeno en las enfermedades inflamatorias y las enfermedades mediadas por el estrés oxidativo, especialmente en roedores, realizamos un ensayo abierto de beber 1,0 litro por día de HEW durante 12 semanas en 14 pacientes con enfermedades musculares e identificamos una mejora en cuatro parámetros: (i) una disminución de la proporción de lactato a piruvato en miopatías mitocondriales (MM) y distrofia muscular progresiva (PMD); (ii) una disminución de la metaloproteinasa-3 de la matriz sérica (MMP3) en la polimiositis/dermatomiositis (PM/DM), (iii) una disminución de la glucosa en ayunas en la PMD y (iv) una disminución de los triglicéridos séricos en la PM/DM. Luego llevamos a cabo un ensayo cruzado aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de 0,5 litros por día de HEW durante 8 semanas en casos de 12 MM y 10 DM. Observamos que HEW mejoró significativamente el lactato sérico en MM. En ambos estudios, algunos pacientes informaron mejoría subjetiva de la fatigabilidad, diarrea y mialgia, pero otros informaron sensación de flotar y empeoramiento de la diarrea. No observamos ninguna mejora o empeoramiento objetivo de los síntomas clínicos durante cada estudio. Nuestros estudios implican que HEW mejora los parámetros clínicos en MM y PM/DM, pero es probable que 0,5 litros/día durante 8 semanas sea insuficiente para demostrar efectos estadísticamente significativos.

## Pacientes y métodos

## Pacientes

Para el ensayo abierto, reclutamos 5 pacientes con PMD, 4 pacientes con PM/DM y 5 pacientes con MM. Los pacientes con PMD comprendían 1 hombre con miopatía de Miyoshi y 4 mujeres con distrofia muscular de cinturas tipo 2B con una edad promedio y SD de  $50,4 \pm 15,9$  años (rango 25 - 66). Los pacientes PM/DM comprendían 2 hombres y 2 mujeres con una edad promedio de  $53,8 \pm 24,8$  años (rango 29 - 83). Todos los casos de PM/DM tomaban de 5 a 10 mg de prednisolona por día y estaban bien controlados. Los pacientes con MM comprendían 4 casos con MELAS (2 hombres y 2 mujeres con una edad promedio de  $45,8 \pm 12,3$  años, rango 37 - 64) y una mujer de 54 años con oftalmoplejía externa progresiva crónica (CPEO).

Para el ensayo cruzado aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, reclutamos 12 pacientes con MM y 10 pacientes con DM. Los pacientes con MM comprendían 5 casos con MELAS (2 hombres y 3 mujeres con una edad promedio de  $44,6 \pm 17,6$  años, rango 20 - 65), así como 7 casos con CPEO (3 hombres y 4 mujeres con una edad promedio de  $49,1 \pm 11,1$  años, rango 29 - 61). Los pacientes con DM fueron 3 hombres y 7 mujeres ~~elocat, durante 7 días en 8 pacientes con infarto del tronco encefálico fue~~

edad promedio de  $49,6 \pm 13,7$  años (rango 32 - 66). Todos los pacientes con DM estaban bien controlados con 5 - 10 mg de prednisolona al día. Tres pacientes con MM y tres con DM participaron en ambos ensayos. Ambos ensayos fueron aprobados por la Junta de Revisión Ética de la Universidad Médica de Aichi.

Se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente.

#### Protocolos

Compramos 500 ml de agua HEW o placebo en una bolsa de aluminio de Blue Mercury Inc. (Tokio, Japón). Medimos las concentraciones de hidrógeno utilizando un sensor de aguja de hidrógeno H2-N conectado a un medidor Picoam de 2 canales PA2000 (Unisense Science, Aarhus, Dinamarca). Las concentraciones de hidrógeno fueron de  $\sim 0,5$  ppm ( $\sim 31\%$  de saturación). También confirmamos que el hidrógeno en el agua de placebo era indetectable con nuestro sistema. Para cada prueba, instruimos a los pacientes para que evacuaran el aire de la bolsa y cerraran herméticamente una tapa de plástico cada vez que bebieran agua para mantener la concentración de hidrógeno lo más alta posible.

Para el ensayo abierto, los pacientes tomaron 1,0 litro por día de HEW en cinco a diez dosis divididas durante 12 semanas. Medimos 18 parámetros séricos y uno urinario y registramos los síntomas clínicos a las 0, 4, 8, 12, 16 semanas.

Para el ensayo doble ciego, los pacientes tomaron 0,5 litros por día de HEW o agua de placebo en dos a cinco dosis divididas durante 8 semanas. Entre los ensayos de 8 semanas con HEW y placebo, colocamos un período de lavado de 4 semanas. Medimos 18 parámetros séricos y registramos síntomas clínicos a las 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 semanas. En el ensayo doble ciego, no medimos los niveles urinarios de 8-isoprostano.

Los datos se analizaron estadísticamente usando ANOVA de medidas repetidas unidireccionales para el ensayo abierto y ANOVA de medidas repetidas bidireccionales para el ensayo doble ciego, ambos seguidos por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni usando Prism versión 4.0c (Graphpad Software, San Diego, CA).

#### Resultados

##### Ensayo abierto

Catorce pacientes con PMD, PM/DM y MM participaron en el estudio y ningún paciente abandonó el estudio. Los pacientes tomaron 1,0 litro de HEW durante 12 semanas y medimos 18 parámetros séricos y uno urinario cada 4 semanas (Tabla 1). No observamos ninguna mejora objetiva o empeoramiento de los síntomas clínicos durante el estudio. Todos los pacientes informaron aumento de la frecuencia de la micción. Dos pacientes con MELAS informaron una mejoría en la fatigabilidad y otro paciente con MELAS se quejó de una leve sensación de flotación ocasional. Estimamos la significación estadística mediante el análisis ANOVA de medidas repetidas unidireccionales y detectamos cinco parámetros (Figura 1). Las proporciones séricas de lactato a piruvato (L/P) de los pacientes con MM eran altas antes del estudio y

disminuyó durante el estudio (Figura 1A). Las proporciones séricas de L/P y los niveles de glucosa en ayunas de los pacientes con PMD se elevaron después del estudio, pero los valores aún se encontraban dentro de los rangos normales (Figuras 1B y 1C). Los niveles séricos de MMP3 de los pacientes con DM se redujeron hasta el 72,9 % antes de HEW, que volvieron a aumentar después del estudio (Figura 1D). Los niveles de triglicéridos séricos de los pacientes con DM se elevaron después del estudio (Figura 1E).

##### Ensayo cruzado, aleatorizado, doble ciego, controlado con

placebo. Doce pacientes con MM y diez con DM participaron en el estudio y ningún paciente abandonó el estudio. Los pacientes tomaron 0,5 litros de HEW o agua placebo durante 8 semanas y medimos 18 parámetros séricos cada 4 semanas (Tabla 2). Un paciente con MM informó un aumento de la frecuencia de la micción en HEW. Un paciente con DM informó una mejoría subjetiva de la fatigabilidad y la diarrea con HEW, pero un paciente con MM informó de un aumento de la diarrea al principio con HEW. Otro paciente con DM informó una mejoría de la mialgia en HEW. Un paciente de MELAS tuvo episodios de hipoglucemias solo con HEW, pero los episodios desaparecieron después de que se redujo la dosis de insulina. No observamos ninguna mejora objetiva o empeoramiento de los síntomas clínicos durante el estudio. El análisis ANOVA bidireccional de medidas repetidas reveló que solo los niveles de lactato sérico se redujeron significativamente en MM por HEW (Figura 2A). Los perfiles temporales de las proporciones séricas L/P en MM (Figura 2B) y de los niveles séricos de MMP3 en DM (Figura 2C) también demostraron respuestas favorables a HEW pero sin significación estadística.

#### Discusión

Realizamos estudios abiertos y doble ciego de HEW en pacientes miopáticos. En el estudio abierto, observamos la importancia estadística de los efectos del hidrógeno en cuatro parámetros: relaciones L/P en MM y PMD; glucosa en ayunas en PMD; MMP3 en PM/DM; y triglicéridos en PM/DM (Figura 1). En el estudio doble ciego, los niveles de lactato sérico mejoraron significativamente en MM. Las relaciones L/P en MM y MMP3 en DM también mejoraron pero sin significancia estadística (Figura 2). Es posible que un pequeño número de participantes en los estudios abiertos y doble ciego no haya podido revelar efectos estadísticamente significativos de HEW.

En MM, el sistema de transferencia de electrones mitocondrial (mETS) se ve comprometido por mutaciones en el ADN mitocondrial [12]. Esto da como resultado una menor entrada de NADH en mETS y eleva los niveles de NADH en el citoplasma, lo que facilita la conversión de piruvato en lactato por la lactato deshidrogenasa. Por lo tanto, el lactato y la relación L/P son marcadores sustitutos útiles para estimar las funciones de mETS y, por lo general, están anormalmente elevados en MM [12]. mETS defectuoso también provoca la fuga de electrones de

Tabla 1 Ensayo abierto de HEW en 14 pacientes miopáticos

	Distrofia muscular progresiva (PMD)			Polimiositis (PM)/Dermatomiositis (DM)			Miopatías mitocondriales (MM)		
	Antes	12 semanas	Después	Antes	12 semanas	Después	Antes	12 semanas	Después
CK (U/L)	3067 ± 1492	3419 ± 1610	3107 ± 2382	124 ± 31	180 ± 97	140 ± 86	187 ± 75	124 ± 47	156 ± 40
HbA1c (%)	5,25 ± 0,44	5,14 ± 0,31	5,16 ± 0,42	6,68 ± 1,61	6,70 ± 1,53	6,90 ± 2,03	7,40 ± 1,70	7,32 ± 1,48	7,38 ± 1,74
Glucosa en ayunas (mmol/L)	5,52 ± 0,16**	5,51 ± 0,08**	5,82 ± 0,11**	7,66 ± 0,11	7,29 ± 1,57	7,69 ± 1,85	8,94 ± 3,24	9,31 ± 4,18	8,96 ± 3,19
lactato (mmol/L)	0,95 ± 0,34	1,15 ± 0,40	1,35 ± 0,40	1,42 ± 0,18	1,66 ± 0,32	1,30 ± 0,27	1,84 ± 0,50	1,87 ± 0,78	1,73 ± 0,65
L/P relación	12,1 ± 0,7*	10,7 ± 1,3*	13,6 ± 2,2*	13,1 ± 0,9	15,0 ± 3,2	12,7 ± 1,0	20,7 ± 2,9*	14,9 ± 3,5*	20,3 ± 3,1*
Creatinina (μmol/L)	34,8 ± 3,1	34,5 ± 6,9	34,7 ± 8,8	58,6 ± 13,7	56,3 ± 10,7	56,6 ± 14,1	48,8 ± 9,0	47,7 ± 9,7	48,6 ± 8,8
BUN (mmol/L)	4,74 ± 1,16	4,20 ± 0,60	4,21 ± 1,05	4,33 ± 0,71	4,11 ± 0,48	4,68 ± 0,74	5,28 ± 1,69	5,89 ± 1,09	5,00 ± 1,58
Ácido úrico (μmol/dL)	295 ± 46	315 ± 61	300 ± 30	319 ± 44	331 ± 71	329 ± 40	208 ± 50	220 ± 60	217 ± 45
8-isoprostano urinario (ng/mg Cr)	303 ± 155	392 ± 173	Dolor en las piernas		222 ± 88	237 ± 86	Dolor en las piernas		274 ± 117
T-chol (mmol/L)	5,42 ± 0,99	5,74 ± 1,02	5,70 ± 0,81	5,28 ± 0,31	5,55 ± 0,93	5,97 ± 1,35	4,52 ± 0,75	4,53 ± 0,34	4,42 ± 0,77
LDL-col (mmol/L)	3,30 ± 1,05	2,86 ± 1,46	2,99 ± 1,15	2,66 ± 0,28	3,21 ± 0,99	3,13 ± 1,02	2,44 ± 0,43	2,27 ± 0,44	2,22 ± 0,45
HDL-col (mmol/L)	1,62 ± 0,21	1,49 ± 0,19	1,62 ± 0,18	2,01 ± 0,73	1,99 ± 0,76	2,02 ± 0,67	1,14 ± 0,79	1,03 ± 0,72	1,04 ± 0,61
Triglicéridos (mmol/L)	1,31 ± 0,46	3,62 ± 4,83	3,07 ± 3,67	2,17 ± 0,63*	2,01 ± 1,21*	3,09 ± 1,22*	0,78 ± 0,34	0,89 ± 0,45	0,73 ± 0,37
WBC (109/L)	5,30 ± 1,32	5,40 ± 1,12	4,80 ± 0,38	10,78 ± 2,08	8,35 ± 3,41	10,10 ± 0,17	5,12 ± 1,27	7,27 ± 2,29	5,93 ± 1,35
RBC (1012/L)	4,17 ± 0,64	3,79 ± 0,42	3,87 ± 0,80	4,01 ± 0,62	4,34 ± 0,36	4,49 ± 0,45	4,33 ± 0,43	4,31 ± 0,78	4,35 ± 0,59
Plaquetas (109/L)	262 ± 42	260 ± 33	270 ± 20	337 ± 123	265 ± 82	270 ± 65	215 ± 25	207 ± 28	217 ± 25
hematócrito	0,375 ± 0,040	0,374 ± 0,038	0,407 ± 0,055	0,337 ± 0,069	0,376 ± 0,041	0,395 ± 0,045	0,381 ± 0,036	0,370 ± 0,047	0,374 ± 0,032
MMP3 (ng/ml)	Dolor en las piernas			307,8 ± 59,1*	224,3 ± 53,4*	283,3 ± 77,6*	Dolor en las piernas		
IgG (mg/dl)	Dolor en las piernas			1343 ± 470	1396 ± 550	1429 ± 581	Dolor en las piernas		

Los valores representan la media ± SD. nd, no determinado. \*p < 0,05 y \*\*p < 0,005 por ANOVA unidireccional de medidas repetidas.

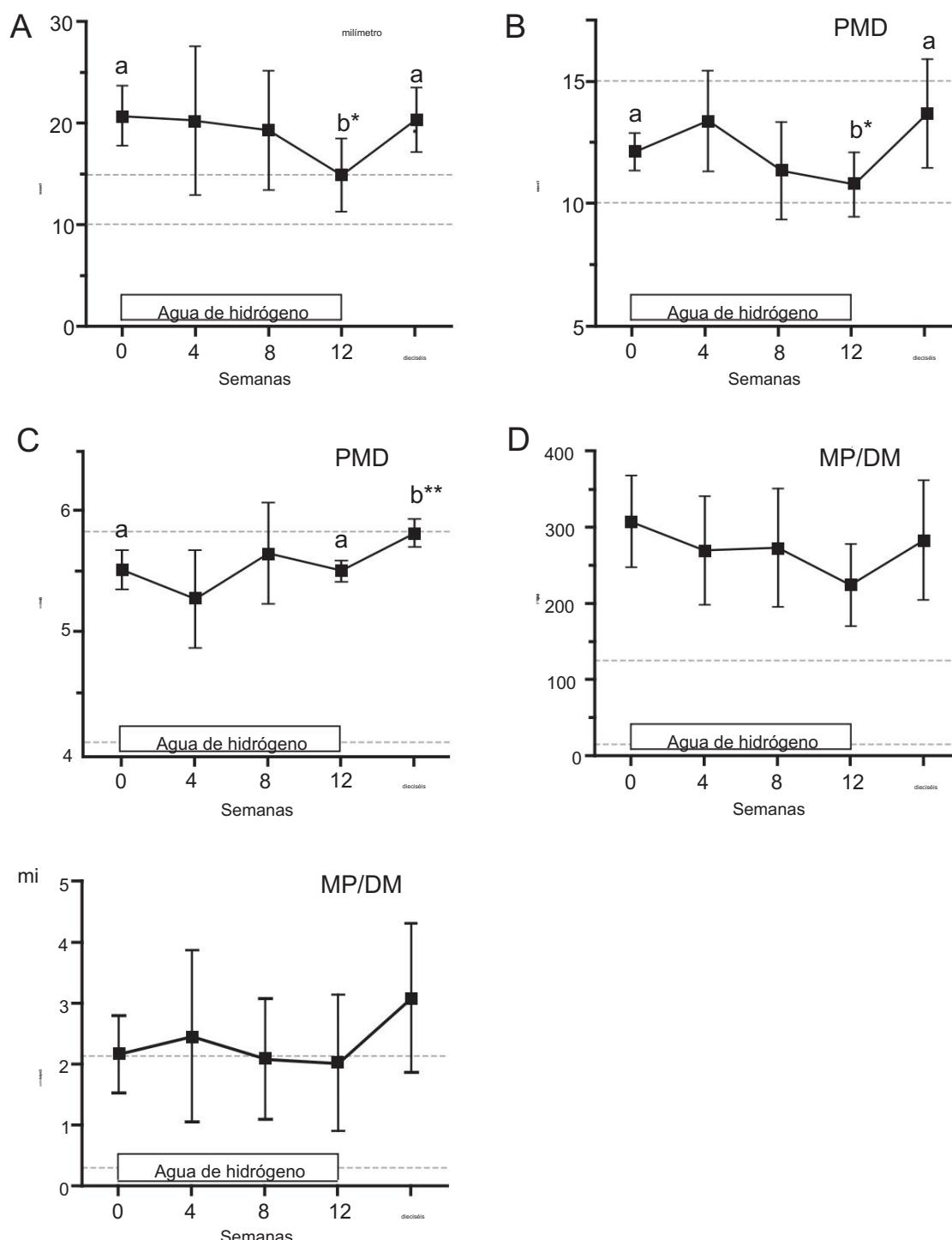


Figura 1 Perfiles temporales de cuatro parámetros que demuestran significancia estadística mediante ANOVA unidireccional de medidas repetidas en el ensayo de etiqueta abierta. Proporciones de lactato/piruvato sérico (L/P) en 5 pacientes con miopatías mitocondriales (MM) (A) y 4 con distrofia muscular progresiva (PMD) pacientes (B). Tenga en cuenta las proporciones L/P anormalmente altas en pacientes con MM. (C) Glucosa en ayunas en 4 pacientes con PMD. (D) MMP3 sérica en 5 polimiositis (PM)/pacientes con dermatomiositis (DM). (E) Triglicéridos séricos en 4 pacientes con PMD. Doce semanas en HEW se indican mediante un recuadro en cada panel. Se representan gráficamente las medias y la desviación estándar. Los valores estadísticamente diferentes según la prueba de comparación múltiple de Bonferroni se indican mediante 'a' y 'b' con \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ . La prueba de Bonferroni no revela ninguna diferencia estadística entre dos valores en (D) y (E). Las líneas discontinuas muestran un rango normal de cada parámetro.

Tabla 2 Ensayo cruzado, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de HEW en 10 pacientes con DM y 12 con MM

	Dermatomiositis (DM)				Miopatías mitocondriales (MM)			
	Agua de hidrógeno		Agua placebo		Agua de hidrógeno		Agua placebo	
	0 semana	8 semanas	0 semana	8 semanas	0 semana	8 semanas	0 semana	8 semanas
CK (U/L)	88,7 ± 24,3	106,1 ± 88,2	93,5 ± 45,0	99,5 ± 86,7	165 ± 86,6	120 ± 55,5	142,0 ± 69,4	221 ± 235
HbA1c (%)	6,23 ± 1,28	6,34 ± 1,55	6,27 ± 1,44	6,16 ± 1,28	6,09 ± 0,94	6,12 ± 1,05	6,06 ± 1,22	6,06 ± 1,02
Glucosa en ayunas (mmol/L)	8,27 ± 3,62	7,81 ± 2,91	6,70 ± 2,11	6,48 ± 1,90	6,05 ± 1,43	5,67 ± 1,99	6,02 ± 1,46	6,11 ± 1,69
Lactato (mmol/L)	1,93 ± 0,78	1,81 ± 0,87	1,80 ± 0,89	1,65 ± 0,77	1,76 ± 0,67*	1,61 ± 0,48*	1,49 ± 0,49*	1,70 ± 0,57*
Relación L/P	13,1 ± 6,0	11,5 ± 2,6	12,1 ± 2,88	15,2 ± 8,3	18,7 ± 8,8	17,9 ± 7,7	7,12 ± 13,4	17,7 ± 8,6
Creatinina (μmol/L)	59,1 ± 15,6	59,1 ± 13,6	58,3 ± 15,0	59,0 ± 19,7	53,6 ± 18,3	52,0 ± 17,4	54,8 ± 20,3	57,5 ± 22,3
BUN (mmol/L)	5,36 ± 1,48	4,82 ± 1,57	5,78 ± 1,71	4,86 ± 1,56	6,08 ± 2,09	5,39 ± 1,54	6,24 ± 1,46	6,34 ± 2,76
Ácido Úrico (μmol/dL)	303 ± 88	320 ± 68	313 ± 75	321 ± 83	413 ± 316	375 ± 229	447 ± 387	408 ± 284
T-chol (mmol/L)	5,23 ± 0,78	5,15 ± 0,85	5,21 ± 0,61	4,95 ± 0,92	4,61 ± 0,78	4,80 ± 0,57	4,69 ± 0,78	4,68 ± 0,71
LDL-col (mmol/L)	3,06 ± 0,82	2,93 ± 0,75	2,97 ± 0,80	3,03 ± 0,84	2,69 ± 0,68	2,82 ± 0,58	2,73 ± 0,67	2,79 ± 0,60
HDL-col (mmol/L)	1,59 ± 0,48	1,56 ± 0,36	1,53 ± 0,47	1,43 ± 0,48	1,47 ± 0,04	1,55 ± 0,34	1,52 ± 0,34	1,45 ± 0,35
Triglicéridos (mmol/L)	1,54 ± 0,65	1,83 ± 0,76	1,86 ± 0,80	1,85 ± 0,48	1,16 ± 0,58	0,92 ± 0,35	0,97 ± 0,36	1,02 ± 0,49
WBC (109/L)	11,7 ± 6,4	10,9 ± 3,1	9,66 ± 2,68	11,2 ± 4,7	5,5 ± 0,1	5,7 ± 1,8	5,81 ± 1,78	5,8 ± 1,9
RBC (1012/L)	4,28 ± 0,05	4,32 ± 0,35	4,37 ± 0,44	4,35 ± 0,44	4,15 ± 0,04	4,17 ± 0,61	4,26 ± 0,67	4,15 ± 0,56
Plaquetas (109/L)	271 ± 10	302 ± 69	306 ± 54	312 ± 79	203 ± 40	214 ± 44	216 ± 48	225 ± 50
Hematocrito (%)	0,380 ± 0,004	0,384 ± 0,040	0,392 ± 0,052	0,391 ± 0,047	0,373 ± 0,004	0,378 ± 0,060	0,386 ± 0,063	0,376 ± 0,058
MMP3 (ng/ml)	245 ± 122	232 ± 84,1	217 ± 93,5	221 ± 112				
IgG (mg/dl)	1211 ± 357	1244 ± 305	1202 ± 340	1282 ± 353				

Los valores representan la media ± SD. nd, no determinado. \*p < 0,05 por ANOVA de medidas repetidas de dos vías.

membranas internas mitocondriales y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que daña mETs [13,14]. Reducción de los ratios L/P en los estudios abiertos y doble ciego sugieren que hidrógeno alivia la disfunción mETs en MM ya sea por eliminando ROS o mediante señalización aún no identificada mecanismos.

MMP3 pertenece a una familia de zinc dependientes del calcio proteinasas inducidas por citoquinas y secretadas por células inflamatorias. Las MMP mejoran la migración de células T y adhesión, y también degradan las proteínas de la matriz extracelular [15]. MMP3 se incrementa en una fracción de DM pacientes [16]. MMP3 puede facilitar la adhesión de linfocitos y mejorar la citotoxicidad mediada por células T al degradar Proteínas de matriz extracelular en DM. Hidrógeno niveles séricos mejorados de MMP3 en la etiqueta abierta y estudios doble ciego, que se espera mejoren procesos inflamatorios patogénicos que culminan en destrucción de fibras musculares.

Observamos efectos menos prominentes con el estudio doble ciego en comparación con el estudio abierto. La falta de significación estadística en el estudio doble ciego es posiblemente debido a una menor cantidad de HEW (1,0 frente a 0,5 litro por día) y a un período de observación más corto (12 vs. 8 semanas). En el estudio abierto, beber 1,0 litro de HEW no fue fácilmente acomodado por la mayoría de los pacientes miopáticos. El hidrógeno no muestra dosis simple

relación de respuesta en roedores [2-4], y ad libitum incluso la administración de HEW saturado al 5% atenúa el desarrollo de la enfermedad de Parkinson en ratones [17]. Así reducimos la cantidad de hidrógeno a 0,5 litro en el ensayo doble ciego, y también acortó el período de observación para minimizar la carga sobre los participantes. Esto, sin embargo, podría haber enmascarado efectos de LABRAR. De hecho, cuando comparamos estudios de diabetes mellitus tipo 2 [6], el ensayo abierto actual y síndrome metabólico [9], los participantes tomaron 0,9, 1,0, y 1,5-2,0 litros de HEW, respectivamente. Razones de total colesterol/colesterol HDL están disponibles a las 8 semanas en todos los estudios, y se cambian a 103,8%, 98,6% y 95,8%, respectivamente, de aquellos antes de la administración de hidrógeno, lo cual está de acuerdo con un efecto dosis-respuesta de HEW. Además, entre los dos estudios anteriores [6,9] y los estudios actuales de etiqueta abierta y doble ciego, los efectos más prominentes se observan con 1,5-2,0 litros de HEW. Como beber una gran cantidad de HEW no es fácilmente acomodado por la mayoría de los pacientes, especialmente en invierno, un efecto umbral y/o una dosis-respuesta efecto debe elaborarse más para cada patológica estado.

## Conclusiones

HEW es eficaz para la disfunción mitocondrial en MM y procesos inflamatorios en la DM. El hidrógeno puede tener

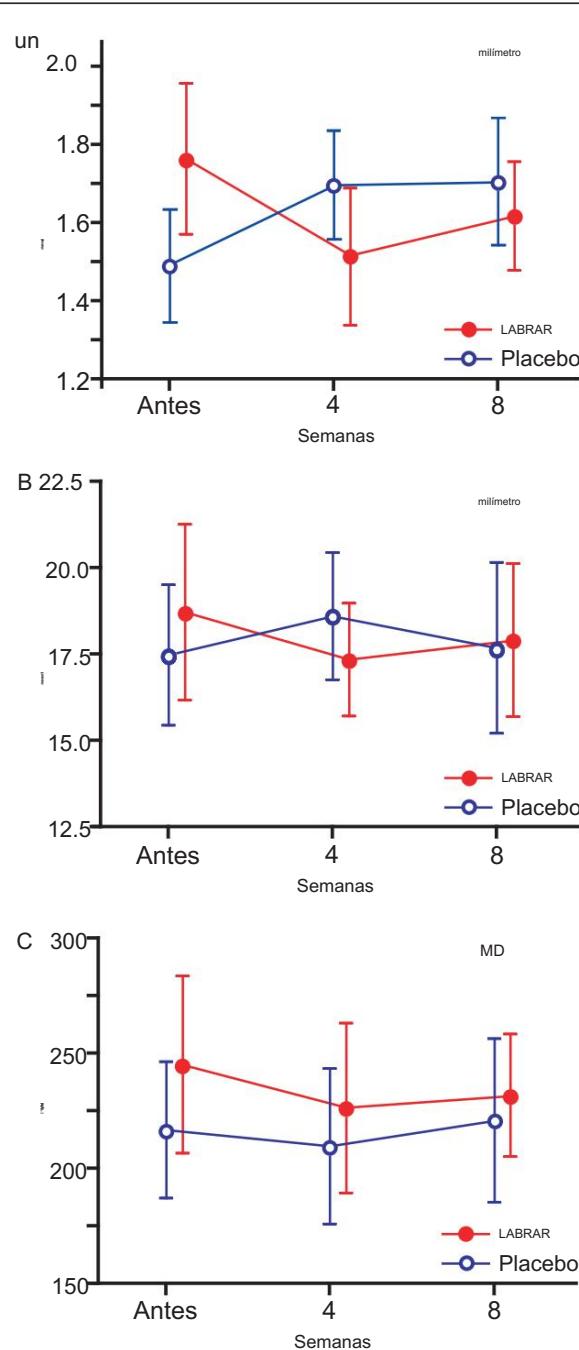


Figura 2 Perfiles temporales de tres parámetros en el ensayo doble ciego. Lactato sérico (A) y relaciones L/P (B) en 12 pacientes con miopatías mitocondriales (MM). (C) MMP3 en suero en 10 pacientes con dermatomiositis (DM). Los pacientes tomaron HEW o placebo durante 8 semanas. Se representan gráficamente las medias y la desviación estándar. (A) Los niveles de lactato sérico en MM son estadísticamente diferentes según ANOVA de medidas repetidas bidireccionales ( $p < 0,05$ , Tabla 1), pero la prueba de comparación múltiple de Bonferroni no revela ninguna diferencia estadística entre los valores. No se observaron diferencias estadísticas en las relaciones L/P (B) y MMP3 sérica (C). El rango normal de lactato es de 0,5 a 2,2 mmol/l. Los rangos normales de los otros parámetros se indican en la Figura 1.

es probable que se requiera un efecto umbral o un efecto dosis-respuesta y 1,0 litro o más por día de HEW para ejercer efectos beneficiosos.

#### Abreviaturas

HEW: agua enriquecida con hidrógeno; PMD: distrofia muscular progresiva; PM: polimiositis; DM: dermatomiositis; MM: miopatías mitocondriales; CPEO: oftalmoplejía externa progresiva crónica; MELAS: miopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios tipo ictus; MMP3: metaloproteína de matriz-3.

#### Agradecimientos Nos

gostaría agradecer a los pacientes por su participación en estos estudios. Agradecemos a Fumiko Ozawa por su asistencia técnica. Este trabajo fue apoyado por subvenciones del Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón y el Ministerio de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología de Japón.

#### Detalles del autor

<sup>1</sup>División de Neurogenética, Centro de Enfermedades Neurológicas y Cáncer, Facultad de Medicina de la Universidad de Nagoya, 65 Tsurumai, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japón. <sup>2</sup>Facultad de Fisiopatología y Terapéutica, Aichi Facultad de Enfermería de la Universidad Médica, 21 Karimata Yazako, Nagakute-cho, Aichi-gun, Aichi 480-1195, Japón. <sup>3</sup>Departamento de Neurología, Facultad de Medicina de la Universidad Médica de Aichi, 21 Karimata Yazako, Nagakute-cho, Aichi-gun, 4 Aichi 480-1195, <sup>4</sup>Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Vida Japón. y Ciencias de la Salud, Universidad de Chubu, 1200 Matsumoto, Kasugai, Aichi 487- 5850, Japón. <sup>5</sup>Departamento de Investigación sobre Longevidad y Envejecimiento, Gifu Instituto Internacional de Biotecnología, 1-1 Nakafudogaoka, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japón.

#### Contribuciones de los

autores TI y KS examinaron pacientes y adquirieron datos. MI1 y TI organizaron datos y realizaron análisis estadísticos. MI1 y KO escribieron el artículo. MI4 y KO concibieron el estudio. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

#### Conflictos de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses.

Recibido: 24 junio 2011 Aceptado: 3 octubre 2011

Publicado: 3 de octubre de 2011

#### Referencias

1. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S: El hidrógeno actúa como un antioxidante terapéutico al reducir selectivamente los radicales de oxígeno citotóxicos. *Nat Med* 2007, 13:688-694.
2. Ohta S, Nakao A, Ohno K: El simposio de hidrógeno molecular médico de 2011: un simposio inaugural de la revista Medical Gas Research. *Med Gas Res* 2011, 1:10.
3. Nakao A, Sugimoto R, Billiar TR, McCurry KR: antioxidante terapéutico Gas Medicinal. *J Clin Biochem Nutr* 2009, 44:1-13.
4. Hong Y, Chen S, Zhang JM: El hidrógeno como antioxidante selectivo: una revisión de estudios clínicos y experimentales. *J Int Med Res* 2010, 38:1893-1903.
5. Itoh T, Fujita Y, Ito M, Masuda A, Ohno K, Ichihara M, Kojima T, Nozawa Y, Ito M: el hidrógeno molecular suprime la transducción de señales mediada por FepsilonRI y previene la desgranulación de los mastocitos. *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 389:651-656.
6. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T: La suplementación con agua rica en hidrógeno mejora el metabolismo de los lípidos y la glucosa en pacientes con diabetes tipo 2 o intolerancia a la glucosa. *Nutr Res* 2008, 28:137-143.
7. Nakayama M, Kabayama S, Nakano H, Zhu WJ, Terawaki H, Nakayama K, Katoh K, Satoh T, Ito S: Efectos biológicos del agua electrolizada en la hemodiálisis. *Nephron Clin Pract* 2009, 112:C9-C15.
8. Nakayama M, Nakano H, Hamada H, Itami N, Nakazawa R, Ito S: Un nuevo sistema de hemodiálisis bioactivo que utiliza dihidrógeno disuelto (H-2)

- producido por electrólisis del agua: un ensayo clínico. *Transplante Nephrol Dial* 2010, 25:3026-3033.
9. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N: Efectividad de Agua rica en hidrógeno sobre el estado antioxidante de sujetos con síndrome metabólico potencial: un estudio piloto de etiqueta abierta. *J Clin Biochem Nutr* 2010, 46:140-149.
10. Kang KM, Kang YN, Choi IB, Gu Y, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A: Efectos del consumo de agua hidrogenada sobre la calidad de vida de pacientes tratados con radioterapia por tumores hepáticos. *Med Gas Res* 2011, 1:11.
11. Ono H, Nishijima Y, Adachi N, Tachibana S, Chitoku S, Mukaihara S, Sakamoto M, Kudo Y, Nakazawa J, Kaneko K, Nawashiro H: Índices de resonancia magnética cerebral mejorados en los sitios de infarto agudo del tronco encefálico tratados con eliminadores de radicales hidroxilo, edaravona e hidrógeno, en comparación con edaravona sola. Un estudio no controlado. *Med Gas Res* 2011, 1:12.
12. DiMauro S: Patogénesis y tratamiento de las miopatías mitocondriales: avances recientes. *Acta Myologica* 2010, 29:333-338.
13. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC: Estrés oxidativo en el envejecimiento humano y enfermedades mitocondriales: consecuencias de la respiración mitocondrial defectuosa y el sistema enzimático antioxidante deteriorado. *Chin J Physiol* 2001, 44:1-11.
14. McKenzie M, Liolitsa D, Hanna MG: Enfermedad mitocondrial: mutaciones y mecanismos. *Neurochem Res* 2004, 29:589-600.
15. Sternlicht MD, Werb Z: cómo las metaloproteínasas de matriz regulan el comportamiento celular. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001, 17:463-516.
16. Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, Komura K, Hasegawa M, Takehara K, Sato S: Autoanticuerpo contra la matriz metaloproteína-3 en pacientes con esclerosis sistémica. *Clin Exp Immunol* 2004, 138:357-363.
17. Fujita K, Seike T, Yutsudo N, Ohno M, Yamada H, Yamaguchi H, Sakumi K, Yamakawa Y, Kido MA, Takaki A, Katafuchi T, Nakabeppu Y, Noda M: El hidrógeno en el agua potable reduce la pérdida neuronal dopaminérgica en el modelo de ratón con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina de la enfermedad de Parkinson. *PLoS One* 2009, 4:e7247.

doi:10.1186/2045-9912-1-24

Citar este artículo como: Ito et al.: Ensayo abierto y ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, cruzado, de agua enriquecida con hidrógeno para miopatías mitocondriales e inflamatorias. *Investigación de gases medicinales* 2011 1:24.

Envíe su próximo manuscrito a BioMed Central y aproveche al máximo:

- Práctico envío en línea
- Revisión minuciosa por pares
- Sin limitaciones de espacio ni cargos por figura de color
- Publicación inmediata al aceptar • Inclusión en PubMed, CAS, Scopus y Google Scholar
- Investigación que está disponible gratuitamente para su redistribución

Envíe su manuscrito a  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

