

# Progreso reciente hacia la medicina del hidrógeno: potencial del hidrógeno molecular para Aplicaciones Preventivas y Terapéuticas

Shigeo Ohta\*

Departamento de Bioquímica y Biología Celular, Instituto de Ciencias del Desarrollo y el Envejecimiento, Escuela de Graduados en Medicina, Nippon Escuela de Medicina

**Resumen:** El estrés oxidativo persistente es una de las principales causas de la mayoría de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, el cáncer y el proceso de envejecimiento. El estrés oxidativo agudo provoca directamente daños graves en los tejidos. A pesar de la importancia clínica del daño oxidativo, los antioxidantes han tenido un éxito terapéutico limitado. Hemos propuesto que el hidrógeno molecular ( $H_2$ ) tiene potencial como un antioxidante "novedoso" en aplicaciones preventivas y terapéuticas [Ohsawa et al., Nat Med. 2007; 13: 688-94]. El  $H_2$  tiene una serie de ventajas como antioxidante potencial: el  $H_2$  se difunde rápidamente en los tejidos y las células, y es lo suficientemente suave como para no perturbar las reacciones redox metabólicas ni afectar las especies reactivas de oxígeno (ROS) que funcionan en la señalización celular, por lo que debería haber pocos efectos adversos por consumir  $H_2$ . Existen varios métodos para ingerir o consumir  $H_2$ , incluyendo la inhalación de hidrógeno gaseoso, beber agua disuelta con  $H_2$  (agua de hidrógeno), tomar un baño de hidrógeno, inyectar  $H_2$ -solución salina disuelta (solución salina de hidrógeno), dejando caer solución salina de hidrógeno en el ojo y aumentando la producción intestinal de  $H_2$  por parte de las bacterias. Desde la publicación del primer artículo sobre  $H_2$  en Nature Medicine en 2007, los efectos biológicos de  $H_2$  han sido confirmados por la publicación de más de 38 enfermedades, estados fisiológicos y pruebas clínicas en las principales revistas médicas y biológicas, y varios grupos han iniciado exámenes clínicos. Además, el  $H_2$  muestra no solo efectos contra el estrés oxidativo, sino también varios efectos antiinflamatorios y antialérgicos.  $H_2$  regula diversas expresiones génicas y fosforilaciones de proteínas, aunque los mecanismos moleculares que subyacen a los marcados efectos de cantidades muy pequeñas de  $H_2$  siguen siendo esquivos.

**Palabras clave:** Antiinflamatorio, antioxidante, hidrogenomedicina, gas médico, mitocondrias, estrés oxidativo, isquemia-reperusión, ROS.

## 1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo surge del fuerte potencial oxidante celular del exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) [1]. El estrés oxidativo agudo surge de una variedad de situaciones, incluida la isquemia reperusión [2]. El estrés oxidativo persistente es ampliamente aceptado como una de las causas de la mayoría de las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, el cáncer y el proceso de envejecimiento [3-7]; sin embargo, muchos suplementos antioxidantes no pudieron prevenir el cáncer, el infarto de miocardio y la aterosclerosis, sino que, por el contrario, aumentaron la mortalidad [8-11]; por lo tanto, es muy importante conocer los efectos secundarios al desarrollar un antioxidante eficaz para la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Encontramos que el hidrógeno molecular ( $H_2$ ) tiene funciones como un antioxidante "novedoso" en aplicaciones preventivas y terapéuticas [12]. El  $H_2$  tiene ventajas como antioxidante potencial sin efectos adversos: es lo suficientemente suave como para no perturbar las reacciones redox metabólicas ni afectar las ROS, que funcionan en la señalización celular [13-15] y tiene características de distribución favorables en su propia capacidad física para penetrar biomembranas y difundirse a través de barreras hacia los componentes celulares.

Aquí, revisamos el progreso reciente hacia aplicaciones terapéuticas y preventivas de  $H_2$  en campos generalizados.

## 2. ROS COMO UNA DE LAS PRINCIPALES CAUSAS DE ENFERMEDADES AGUDAS Y CRÓNICAS

### 2.1. Estrés oxidativo persistente

Las ERO se generan dentro del cuerpo a lo largo de nuestra vida diaria, como durante el ejercicio intenso, el tabaquismo, la exposición a los rayos ultravioleta o la contaminación del aire, el envejecimiento, el estrés físico o psicológico, etc. [16-19]. Dentro de cada organismo aeróbico, las ROS se generan cuando la respiración consume oxígeno.

Como primer paso para generar ROS persistentes, la mayoría de los radicales de anión superóxido ( $\bullet O_2^-$ ) se generan en las mitocondrias por la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones [3, 7, 20, 21].

La superóxido dismutasa se convierte en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que es metabolizado por la glutatión peroxidasa o catalasa para generar agua ( $H_2O$ ). Los radicales hidroxilo altamente reactivos ( $\bullet OH$ ) se generan a partir de  $H_2O_2$  a través de la reacción de Fenton o Weise en presencia de metales catalíticamente activos, como  $Fe^{2+}$  y  $Cu^+$  [22]; por lo tanto, la manipulación de los genes involucrados en la antioxidación prolongó la vida útil o previno modelos de enfermedades [23-27].

Estas ROS se generan bajo la condición de un potencial de membrana excesivamente alto para filtrar electrones de la cadena de transporte de electrones [28]. De hecho, las proteínas desacopladoras controlan el potencial de membrana para suprimir la producción de ROS y, en consecuencia, para reprimir la diabetes [29-31].

La aldehído hidrogenasa mitocondrial 2 (ALDH2) funciona como un protector contra el estrés oxidativo al desintoxicar los aldehídos citotóxicos, como el 4-hidroxi-2-nonenal [4, 5, 32]. Por lo tanto, un defecto de ALDH2 induce suficientemente fenotipos de demencia dependiente de la edad mediante la acumulación de dichos aldehídos citotóxicos [32]. Paradójicamente, estos aldehídos estimulan los sistemas de protección contra el estrés oxidativo [33]. Así, el estrés oxidativo tiene dos caras, dañar los tejidos y potenciar los sistemas de protección.

### 2.2. Estrés oxidativo agudo

El estrés oxidativo agudo surge de varias situaciones diferentes: inflamación, infarto cardíaco o cerebral, trasplante de órganos, ejercicio intenso, cese del sangrado operatorio y otros [2, 34, 35]. En muchos casos, la reperusión de isquemia es una causa crítica para elevar el estrés oxidativo agudo. En el infarto de miocardio, la generación acelerada de ROS por reperusión del miocardio isquémico es un mediador potencial del daño por reperusión [36-39]. Durante la reperusión miocárdica, se genera  $\bullet O_2^-$  dentro de las mitocondrias lesionadas a través de la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones.  $\bullet O_2^-$

se convierte en  $H_2O_2$ , y se genera  $\bullet OH$  altamente reactivo a partir de  $H_2O_2$  como se mencionó [22, 40].

Estos ROS median la lesión miocárdica al inducir la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), lo que provoca una pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y conduce a la inflamación mitocondrial con ruptura de la membrana [41]. Se han hecho muchos intentos de inhibir la producción de ROS para limitar el alcance de la reperusión.

\*Correspondencia de la dirección a este autor en el 1-396, Kosugi-machi, Naka hara-ku, ciudad de Kawasaki, Kanagawa pref. 211-8533 Japón; Teléfono: +81-44-733-9267; Fax: +81-44-733-9268; Correo electrónico: ohta@nms.ac.jp

lesión. La administración de secuestrantes de ROS en el momento de la reperfusión ha producido resultados contradictorios que pueden explicarse parcialmente por el papel dual de las ROS en los corazones de isquemia-reperfusión [42, 43]. La mayoría de los efectos perjudiciales asociados con la lesión letal por reperfusión se atribuyen a la  $\bullet\text{OH}$ . En comparación,  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  tienen menos energía oxidativa y, paradójicamente, están implicados como componentes de señalización cruciales en el establecimiento de la tolerancia al estrés oxidativo [44, 45]. Por lo tanto, los radicales citotóxicos como el  $\bullet\text{OH}$  deben neutralizarse sin comprometer las actividades biológicas esenciales de otras ERO, incluido el  $\text{NO}$  [46, 47].

3. CARACTERÍSTICAS DEL HIDRÓGENO MOLECULAR

Descubrimos que el  $\text{H}_2$  funciona como un antioxidante suave pero efectivo [12]. El hidrógeno es el elemento más abundante en el universo, constituyendo casi el 75% de la masa del universo; sin embargo, el hidrógeno está ausente en la tierra en su forma monoatómica y está presente en el agua y en compuestos orgánicos o inorgánicos. El gas hidrógeno, con la fórmula molecular  $\text{H}_2$ , es un gas diatómico incoloro, inodoro, insípido y altamente combustible. La atmósfera terrestre contiene menos de 1 parte por millón de gas hidrógeno [48].

El  $\text{H}_2$  es bastante menos activo y se comporta como un gas inerte en ausencia de catalizadores o a temperatura corporal. El  $\text{H}_2$  no reacciona con la mayoría de los compuestos, incluido el oxígeno gaseoso a temperatura ambiente. El hidrógeno gaseoso es inflamable solo a una temperatura superior a 527 °C y explota por una rápida reacción en cadena con el oxígeno solo en el rango explosivo de la concentración de  $\text{H}_2$  (4 - 75 %, vol/vol).

El  $\text{H}_2$  se puede disolver en agua hasta 0,8 mM (1,6 ppm, peso/vol) a presión atmosférica, y el  $\text{H}_2$  penetra rápidamente en las paredes de vidrio y plástico de cualquier recipiente, mientras que los recipientes de aluminio pueden retener gas hidrógeno durante mucho tiempo.

4. EFECTOS DE ELIMINACIÓN DE RADICALES HIDROXILO EN CÉLULAS CULTIVADAS

4.1. Barrido  $\bullet\text{OH}$ , pero no  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{NO}$  en Cultivados Células

**$\text{H}_2$  elimina  $\bullet\text{OH}$ , pero no  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{NO}$  en células cultivadas.**  
El  $\text{H}_2$  se disolvió en medio de cultivo a alta presión de hidrógeno gaseoso o simplemente burbujear con hidrógeno gaseoso. El medio se combinó con medio saturado de  $\text{O}_2$  en una proporción de 8:2 ( $\text{H}_2$ :  $\text{O}_2$ ). Las concentraciones de hidrógeno y oxígeno y el pH se monitorearon con cada electrodo específico. Las células cultivadas se trataron con un inhibidor del complejo respiratorio III mitocondrial, antimicina A, para inducir una producción excesiva de  $\bullet\text{O}_2^-$ . Después de tal tratamiento,  $\bullet\text{O}_2^-$  se convirtió rápidamente en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y luego en  $\bullet\text{OH}$ . La adición de antimicina A en realidad incrementó los niveles de  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  dentro de las células; sin embargo,  $\text{H}_2$  disueltas en medio de cultivo no cambiaron sus niveles. Además, el  $\text{H}_2$  no disminuyó el nivel de  $\text{NO}$  en estado estacionario en las células. Por el contrario, el tratamiento con  $\text{H}_2$  redujo significativamente los niveles de  $\bullet\text{OH}$ , a juzgar por la disminución de la señal fluorescente de la hidroxifenilfluoresceína (HPF) [49] y de las señales de la trampa de espín. En particular,  $\text{H}_2$  disminución de los niveles de  $\bullet\text{OH}$  incluso en la región nuclear [12].

Después del tratamiento con antimicina A, el  $\text{H}_2$  evitó la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Esto sugirió que el  $\text{H}_2$  protegía a las mitocondrias de  $\bullet\text{OH}$ . Junto con este efecto protector, el  $\text{H}_2$  también evitó una disminución en el nivel celular de ATP sintetizado en las mitocondrias. El hecho de que el  $\text{H}_2$  protegiera las mitocondrias y el ADN nuclear proporcionó pruebas de que el  $\text{H}_2$  penetraba en la mayoría de las membranas y se difundía en los orgánulos. En consecuencia,  $\text{H}_2$  protegió a las células cultivadas contra el estrés oxidativo [12].

4.2. Otros efectos mostrados por el uso de sistemas de cultivo

El  $\text{H}_2$  se disolvió en células ciliadas auditivas cultivadas en medio protegidas de los radicales libres [50] y se sugiere que disminuye el  $\bullet\text{OH}$ , a juzgar por la disminución de la fluorescencia HPF en el tejido vestibular [51].

$\bullet\text{OH}$  causa la mayor parte del daño celular inducido por radiación ionizante.  $\text{H}_2$  exhibió efectos protectores contra el daño inducido por radiación en

células cultivadas y ratones [52]. Se sabe que la radiación cósmica induce daños en el ADN y los lípidos asociados con un mayor estrés oxidativo y sigue siendo una preocupación importante en los viajes espaciales. Se espera que las actividades de las misiones espaciales aumenten en los próximos años tanto en número como en duración. Por lo tanto, es importante estimar y prevenir los riesgos que enfrentan los astronautas debido al estrés oxidativo antes de desarrollar síntomas clínicos de enfermedad. Schönfeld et al. planteó la hipótesis de que la administración de  $\text{H}_2$  a los astronautas, ya sea por inhalación o bebiendo agua con hidrógeno, podría generar una estrategia preventiva/terapéutica novedosa y factible para prevenir eventos adversos inducidos por la radiación [53].

Por otro lado, el tratamiento con  $\text{H}_2$  prolongó la vida replicable de las células estromales multipotenciales de la médula ósea in vitro al tiempo que preservaba la diferenciación y los potenciales paracrinós. La terapia celular con células estromales multipotenciales de médula ósea/células madre mesenquimales representa un enfoque prometedor en el campo de la medicina regenerativa. La baja frecuencia de células madre mesenquimales en la médula ósea adulta requiere la expansión ex vivo de células madre mesenquimales después de la recolección; sin embargo, dicha manipulación provoca la senescencia celular con pérdida de los potenciales de diferenciación, proliferativos y terapéuticos de las células madre mesenquimales. Dado que el estrés oxidativo es uno de los insultos clave que promueven la senescencia celular tanto in vivo como in vitro, el  $\text{H}_2$  evitó el proceso de senescencia durante la expansión de las células madre mesenquimales. En particular, el tratamiento con gas hidrógeno al 3 % no disminuyó el  $\bullet\text{OH}$ , la proteína carbonilo y la 8-hidroxideoxiguanosina, lo que sugiere que la eliminación del  $\bullet\text{OH}$  podría no ser responsable de estos efectos del gas hidrógeno en este estudio [54].

5. VENTAJAS DEL HIDRÓGENO

5.1. Difusión Rápida

$\text{H}_2$  tiene una serie de ventajas como un antioxidante potencial. Primero, tiene características de distribución favorables con su propia capacidad física para penetrar biomembranas y difundirse en el citosol.

El daño oxidativo excesivo es un factor importante porque la cadena respiratoria mitocondrial es una fuente importante de especies reactivas de oxígeno dañinas; sin embargo, a pesar de la importancia clínica del daño oxidativo mitocondrial, los antioxidantes han tenido un éxito terapéutico limitado. Esto puede deberse a que las mitocondrias no absorben selectivamente los antioxidantes [55-57]. Como el  $\text{H}_2$  llega efectivamente al núcleo y las mitocondrias, la protección del ADN nuclear y las mitocondrias sugiere efectos preventivos sobre las enfermedades relacionadas con el estilo de vida, el cáncer y el proceso de envejecimiento [12]. Además, el  $\text{H}_2$  atraviesa la barrera hematoencefálica, aunque la mayoría de los compuestos antioxidantes no pueden hacerlo; esto también es una ventaja de  $\text{H}_2$ .

El monitoreo de la concentración de  $\text{H}_2$  dentro de varios tejidos puede probar la difusión gaseosa [58].

5.2. Sin eliminación directa de ROS funcionalmente importantes

A pesar de sus efectos citotóxicos, las bajas concentraciones de ROS, como  $\bullet\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , funcionan como moléculas de señalización y regulan la apoptosis, la proliferación celular y la diferenciación [14, 15]. Como se mencionó, inesperada y notablemente, estudios recientes han sugerido que el exceso de antioxidantes aumenta la mortalidad y las tasas de cáncer [9, 11, 59-62] porque pueden interferir con algunos mecanismos defensivos esenciales [13, 60, 63-67]. A concentraciones más altas, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se convierte en ácido hipocloroso por la mieloperoxidasa para defenderse de la invasión bacteriana [68]. Además, el  $\text{NO}$  funciona como neurotransmisor y es esencial para la dilatación de los vasos sanguíneos [69].

Dado que el  $\text{H}_2$  reduce el  $\bullet\text{OH}$  pero no afecta el  $\bullet\text{O}_2^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  tiene funciones fisiológicas [12], proponemos que los efectos adversos del  $\text{H}_2$  son muy pequeños en comparación con otros antioxidantes.

5.3. Sin toxicidad incluso a mayor concentración.

Se espera que varios gases medicinales proporcionen intervenciones terapéuticas y medicina preventiva más eficaces a pesar de su

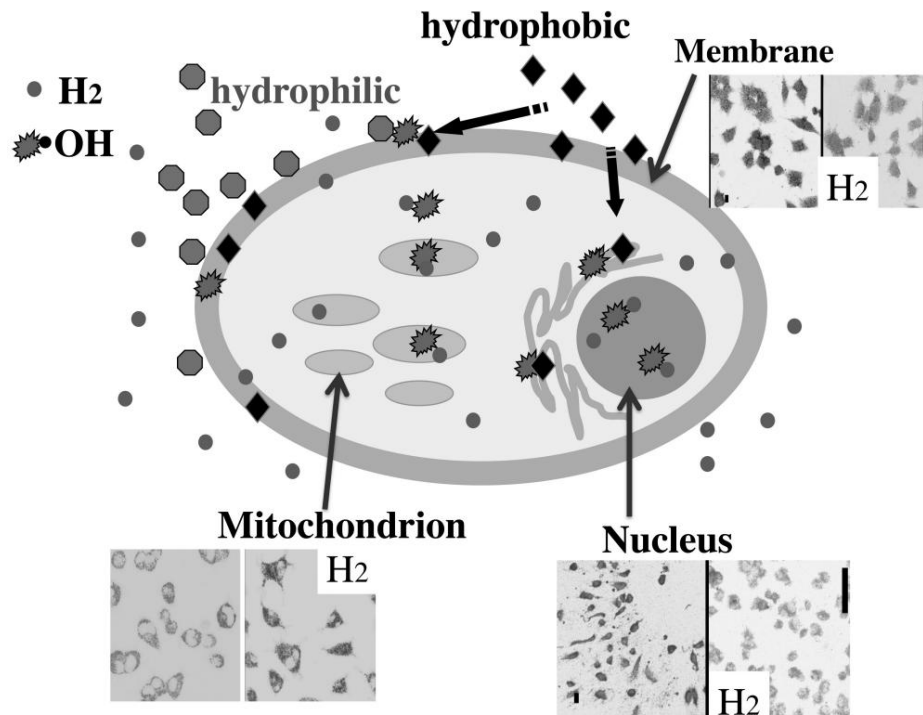


Figura 1). Ilustración de la difusión gaseosa de H<sub>2</sub> en una célula. La mayoría de los compuestos hidrofílicos (●) se retienen en las membranas y no pueden llegar al citosol, mientras que la mayoría de los hidrofóbicos (◆) no puede penetrar biomembranas en ausencia de portadores específicos. Por el contrario, H<sub>2</sub> (●) puede distribuirse rápidamente en el citosol y los orgánulos.

Las células PC12 se colocaron en medios de cultivo que contenían H<sub>2</sub> (0,6 mM) y O<sub>2</sub> (0,24 mM), y luego se indujo el estrés oxidativo mediante la adición de antimicina A (10 µg/mL), un inhibidor de la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias, y se mantuvo durante 1 día. Se detectaron dos marcadores de estrés oxidativo mediante inmunotinción con anti-8-hidroxi-guanina (Núcleo) y anti-4-hidroxi-2-nonenal (Membrana). Treinta minutos después de agregar antimicina A con o sin H<sub>2</sub>, se agregó éster metílico de tetrametilrodamina (TMRM) 100 nM, un detector fluorescente del potencial de membrana de la mitocondria, se incubó durante 10 min y se tomaron imágenes de las células con un microscopio confocal de barrido láser. Estos resultados indican que el H<sub>2</sub> llega al núcleo y a la mitocondria y los protege.

toxicidad severa. La inhalación de gases como terapia de enfermedades ha recibido un interés reciente [70]. En las últimas décadas, ha habido un crecimiento extraordinario y rápido en nuestro conocimiento de las moléculas gaseosas, incluido el óxido nítrico (NO), el monóxido de carbono (CO) y el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), que se sabe que juegan un papel importante en los sistemas biológicos [71, 72].

En modelos experimentales preclínicos de enfermedad, incluida la lesión por isquemia-reperfusión, la inhalación de CO o H<sub>2</sub>S exógeno ha producido un resultado favorable para la mayoría de los órganos vitales [73-76]. En particular, el NO ha sido aprobado como agente terapéutico en la práctica clínica [77]. La toxicidad inherente de estos gases debe investigarse para que la inhalación de gases se considere una estrategia terapéutica eficaz, ya que estos gases son altamente tóxicos en concentraciones considerables. Además, el NO aumenta el estrés oxidativo a través de la reacción con •O<sub>2</sub> – mediante la producción de peroxinitrito altamente oxidativo (NO + •O<sub>2</sub> – ONOO–). Se desconoce si el umbral terapéuticamente efectivo para CO o H<sub>2</sub>S puede alcanzarse localmente en los órganos diana sin liberar un nivel potencialmente tóxico de los gases a través de los pulmones.

Por el contrario, el H<sub>2</sub> tiene más ventajas desde el punto de vista de la toxicidad: el H<sub>2</sub> no tiene citotoxicidad incluso a altas concentraciones [78-81]. Además, se han establecido estándares de seguridad para altas concentraciones de hidrógeno gaseoso para inhalación, ya que el hidrógeno gaseoso a alta presión se usa en mezclas de gases de buceo profundo para prevenir la enfermedad por descompresión y los trombos arteriales gaseosos [81]. La seguridad del H<sub>2</sub> para los seres humanos queda demostrada por su aplicación en Hydrex, una mezcla exótica de gases respirables de 49 % H<sub>2</sub>, 50 % helio y 1 % O<sub>2</sub>, que se utiliza para prevenir la enfermedad por descompresión y la narcosis por nitrógeno durante el buceo técnico muy profundo [78-81].

## 6. MÉTODOS DE INGESTA DE HIDRÓGENO I: INHALACIÓN DE HIDRÓGENO GAS

### 6.1. Inhalación de gas hidrógeno

La inhalación de gas hidrógeno es un método terapéutico sencillo. El gas de hidrógeno se puede inhalar administrando gas de hidrógeno a través de un circuito de ventilación, mascarilla o cánula nasal. Dado que el gas de hidrógeno inhalado actúa más rápidamente, puede ser adecuado para la defensa contra el estrés oxidativo agudo. En particular, la inhalación de gas no afecta la presión arterial [12]; La presión arterial aumentada por la infusión puede causar serios obstáculos durante el tratamiento del infarto de miocardio. El gas hidrógeno no presenta riesgo de explosión en el aire ni en el oxígeno puro cuando está presente en concentraciones < 4 %, como se mencionó anteriormente; sin embargo, la seguridad podría ser una preocupación y la concentración deseada de H<sub>2</sub> debe monitorearse y mantenerse con una herramienta aprobada y disponible comercialmente.

Las ratas inhalaban hidrógeno gaseoso en una mezcla de óxido nítrico (N<sub>2</sub>O) (para anestesia), O<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>. La inhalación de H<sub>2</sub> en realidad aumentó H<sub>2</sub> disuelto en la sangre arterial dependiendo de las concentraciones de hidrógeno gaseoso, y los niveles de H<sub>2</sub> en la sangre venosa eran más bajos que en la sangre arterial; el diferente nivel entre sangre arterial y venosa indica la cantidad de H<sub>2</sub> incorporada en los tejidos [12].

### 6.2. Demostración directa de la difusión rápida de hidrógeno como gas medicinal

Los gases poseen la capacidad de difundirse fácilmente en diferentes materiales y distribuirse uniformemente dentro de un espacio definido. Se supone que los "gases biológicos" se difunden libremente a través de las membranas biológicas, actuando en una variedad de capacidades funcionales [70]; El hidrógeno gaseoso es un ejemplo de esto.

De hecho, la difusión gaseosa de H<sub>2</sub> se prueba al monitorear su concentración dentro de varios tejidos. El H<sub>2</sub> se puede detectar con electrodos específicos. La concentración de H<sub>2</sub> ha sido monitoreada dentro de un miocardio de rata. El electrodo se insertó en el miocardio no isquémico del ventrículo izquierdo. La tasa incremental de saturación de H<sub>2</sub> para el miocardio no isquémico y la sangre arterial fue similar. Luego, el electrodo se insertó en el área 'en riesgo' de infarto para investigar la difusión de H<sub>2</sub> en el miocardio isquémico, inducida por la oclusión de la arteria coronaria. En particular, la concentración de H<sub>2</sub> aumentó incluso en el miocardio isquémico. Aunque la tasa incremental de saturación de H<sub>2</sub> fue más lenta en el miocardio isquémico que en el miocardio no isquémico, el nivel máximo de H<sub>2</sub>

en el miocardio isquémico fue aproximadamente dos tercios del valor observado para el miocardio no isquémico [58].

### 6.3. Efectos protectores sobre el modelo de reperfusión de isquemia por infarto cerebral de rata

Se aplicó gas hidrógeno a un modelo de rata de reperfusión de isquemia como modelo agudo [82]. Producimos isquemia focal por oclusión de la arteria cerebral media de rata con reperfusión posterior. Un día después de la oclusión de la arteria cerebral media, los volúmenes de infarto disminuyeron de manera dependiente de H<sub>2</sub>. Una semana después de la oclusión de la arteria cerebral media, aumentó la diferencia en los volúmenes de infarto entre las ratas no tratadas y las tratadas con H<sub>2</sub>. Las ratas tratadas con H<sub>2</sub> también mostraron mejoras en el peso corporal y la temperatura y defectos de movimiento en comparación con las ratas no tratadas. Por lo tanto, H<sub>2</sub> suprimió no solo la lesión cerebral inicial, sino también la progresión de la lesión. H<sub>2</sub> disminuyó notablemente varios marcadores de estrés oxidativo. En este experimento, H<sub>2</sub> se demostró que tiene el potencial de disminuir notablemente el estrés oxidativo y suprimir la lesión cerebral [12].

### 6.4. Efectos protectores sobre la lesión por reperfusión por isquemia hepática y cardíaca A

continuación, también se aplicó la inhalación de gas hidrógeno a un modelo de lesión por reperfusión por isquemia hepática [83]. La inhalación de H<sub>2</sub> atenuó claramente la degeneración inducida por la reperfusión de isquemia hepática y aumentó el efecto protector de forma dependiente de H<sub>2</sub>. Por el contrario, el gas helio (He) no mostró ningún efecto, lo que indica que el H<sub>2</sub> claramente tiene un efecto protector específico [84].

El grado de cardioprotección frente a la lesión por isquemia-reperfusión se evaluó midiendo el daño oxidativo y el tamaño del infarto tras la oclusión y reperfusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. La inhalación de un nivel incombustible de hidrógeno gaseoso (2%) antes de la reperfusión redujo significativamente la lesión miocárdica inducida por el estrés oxidativo y el tamaño del infarto sin afectar los parámetros hemodinámicos y, por lo tanto, evitó la remodelación perjudicial del ventrículo izquierdo [58].

### 6.5. Efectos protectores en el trasplante de órganos La

inhalación de H<sub>2</sub> mejoró significativamente la lesión del trasplante intestinal y pulmonar y previno la inflamación de órganos remotos a través de sus efectos antioxidantes [85, 86]. La lesión por isquemia/reperfusión durante el trasplante de intestino delgado y de pulmón suele causar complicaciones, como dismotilidad, inflamación e insuficiencia orgánica.

El tratamiento con H<sub>2</sub> mejoró significativamente el tránsito gastrointestinal, así como la contractilidad del músculo liso yeyunal en respuesta al betanecol [86]. La peroxidación lipídica del injerto se redujo significativamente en presencia de H<sub>2</sub>, lo que demuestra los efectos antioxidantes del H<sub>2</sub> en los pulmones trasplantados. La exposición a gas hidrógeno al 2% bloqueó significativamente la producción de varios mediadores proinflamatorios y redujo la apoptosis con la inducción de las moléculas antiapoptóticas Linfoma de células B-2 y Linfoma de células B-extra grande.

La lesión por reperfusión de isquemia fría cardíaca de rata se mejoró con H<sub>2</sub> inhalado o monóxido de carbono (CO), o ambos. La terapia combinada con H<sub>2</sub> y CO demostró una mayor eficacia terapéutica a través de mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios, y puede ser un enfoque clínicamente factible para prevenir la isquemia por frío.

lesión por fusión del miocardio [87]. El gas de hidrógeno inhalado redujo eficazmente las respuestas inflamatorias asociadas a la lesión pulmonar inducida por el ventilador, tanto a nivel local como sistémico, a través de sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos [88].

### 6.6. Efectos protectores en enfermedades infecciosas y efectos antiinflamatorios

La sepsis, un síndrome de disfunción orgánica múltiple, es la principal causa de muerte en pacientes en estado crítico [89]. La inhalación de gas hidrógeno mejoró significativamente la tasa de supervivencia y el daño orgánico de ratones sépticos con ligadura y punción cecal moderada o severa al reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias tempranas y tardías en suero y tejidos [90].

Se investigaron los efectos del tratamiento con H<sub>2</sub> al 2% sobre la tasa de supervivencia y el daño orgánico en el modelo de inflamación generalizada inducida por zymosan. Los efectos beneficiosos del daño de órganos inducido por zymosan del tratamiento con H<sub>2</sub> se asociaron con niveles reducidos de producto oxidativo, actividades aumentadas de enzimas antioxidantes y niveles reducidos de citoquinas proinflamatorias tempranas y tardías en suero y tejidos. El tratamiento con H<sub>2</sub> protegió contra el daño de múltiples órganos en un modelo de inflamación generalizada inducida por zymosan, lo que sugiere el uso potencial de H<sub>2</sub> como agente terapéutico en la terapia de afecciones asociadas con el síndrome de disfunción de múltiples órganos relacionado con la inflamación [91].

### 6.7. Otros

Otros informes tenían los siguientes títulos: La terapia con hidrógeno reduce la apoptosis en el modelo de rata con hipoxia-isquemia neonatal [92]; el gas hidrógeno redujo la transformación hemorrágica potenciada por hiperglucemia aguda en un modelo de rata con isquemia focal [93]; el hidrógeno es neuroprotector y preserva la reactividad cerebrovascular en cerdos recién nacidos asfixiados [94]; efectos beneficiosos del gas hidrógeno en un modelo de rata de lesión cerebral traumática a través de la reducción del estrés oxidativo [95]; efectos benéficos del gas hidrógeno contra la lesión por reperfusión de la isquemia de la médula espinal en conejos [96]; y el hidrógeno protege las células ciliadas vestibulares de los radicales libres [97].

## 7. MÉTODOS DE INGESTA DE HIDRÓGENO II: INGESTIÓN ORAL DE AGUA HIDRÓGENA

### 7.1. Ingestión oral bebiendo agua con hidrógeno Dado que el

gas hidrógeno inhalado actúa más rápidamente, puede ser adecuado para la defensa contra el estrés oxidativo agudo. En particular, la inhalación de gas no afecta la presión arterial; la presión arterial aumentada por la infusión puede ser grave en el infarto de miocardio; sin embargo, la inhalación de gas hidrógeno puede ser inadecuada o no práctica como consumo continuo de H<sub>2</sub> en la vida diaria para uso preventivo. Por el contrario, el H<sub>2</sub> solubilizado (agua disuelta en H<sub>2</sub>; es decir, agua hidrogenada) puede ser beneficioso ya que es un medio portátil, fácil de administrar y seguro para administrar H<sub>2</sub> [98]. El H<sub>2</sub> se puede disolver en agua hasta 0,8 mM a presión atmosférica a temperatura ambiente, como se mencionó anteriormente. Inesperadamente, beber agua con hidrógeno tuvo efectos comparables a la inhalación de gas hidrógeno [99].

El agua de hidrógeno se puede hacer por varios métodos, incluida la disolución de hidrógeno gaseoso en agua a alta presión, la disolución de H<sub>2</sub> electrolizado en agua y por la reacción de magnesio metálico con agua. El método de disolución de hidrógeno gaseoso a alta presión tiene la ventaja de que es aplicable no solo con agua sino también con cualquier otro disolvente.

Cuando se colocó agua saturada con H<sub>2</sub> en el estómago de una rata, se detectó H<sub>2</sub> en varios niveles de  $\mu\text{M}$  en la sangre [98, 99]. Además, el H<sub>2</sub> hepático se controló con un electrodo de hidrógeno tipo aguja y el H<sub>2</sub> se acumuló después de la administración oral de agua hidrogenada, lo que explica en parte por qué el consumo de incluso una pequeña cantidad de H<sub>2</sub> durante un tiempo de permanencia breve podría mejorar de manera eficiente varios modelos de enfermedades. Un experimento in vitro adicional confirmó que

los polímeros de carbohidratos, incluidos el glucógeno y el almidón, tienen afinidad por el H<sub>2</sub> [99].

## 7.2. Prevención del deterioro cognitivo

El estrés crónico por restricción física en ratones mejoró los niveles de estrés oxidativo en el cerebro y perjudicó el aprendizaje y la memoria [100, 101]. El consumo de agua hidrogenada ad libitum suprimió el aumento del estrés oxidativo y previno el deterioro cognitivo. La proliferación neural en la circunvolución dentada del hipocampo fue suprimida por el estrés de restricción [101]. El consumo de agua con hidrógeno mejoró la proliferación reducida; sin embargo, sigue sin estar claro un vínculo mecánico entre los cambios dependientes de H<sub>2</sub> en la neurogénesis y las deficiencias cognitivas. Por lo tanto, el consumo continuo de agua hidrogenada redujo el estrés oxidativo en el cerebro y evitó la disminución del aprendizaje y la memoria inducida por el estrés [98].

## 7.3. Modelo de efectos preventivos y terapéuticos en la enfermedad de Parkinson

En la enfermedad de Parkinson, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo asociado son las principales causas de la pérdida de células dopaminérgicas en la sustancia negra [102]. Se administró H<sub>2</sub> en el agua potable antes o después de la cirugía estereotáctica para la degeneración nigroestriatal inducida por 6-hidroxidopamina en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson. El agua de hidrógeno evitó tanto el desarrollo como la progresión de la degeneración nigrostriatal. Es probable que el agua hidrogenada retrase el desarrollo y la progresión de la enfermedad de Parkinson [103].

Beber agua hidrogenada suprimió la pérdida neuronal dopaminérgica en otro modelo de enfermedad de Parkinson inducido por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) [104].

## 7.4. Modelo de prevención de la aterosclerosis

El estrés oxidativo está involucrado en la aterosclerosis [105, 106]; sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos de antioxidantes dietéticos no lograron mostrar un éxito marcado en la prevención de enfermedades ateroscleróticas [8, 107, 108]. Beber agua hidrogenada ad libitum disminuyó el nivel de estrés oxidativo de la aorta y previno la arteriosclerosis en un ratón con apolipoproteína E inactivada [109]. Por lo tanto, el consumo de agua hidrogenada tiene potencial para prevenir la arteriosclerosis de manera más efectiva que otros antioxidantes [110].

## 7.5. Mejora del Síndrome Metabólico

El aumento del estrés oxidativo en la obesidad afecta el síndrome metabólico [111]. El consumo prolongado de agua hidrogenada controló significativamente la grasa y el peso corporal, a pesar de que no hubo cambios en el consumo de alimentos y agua. Además, beber agua hidrogenada redujo los niveles de glucosa, insulina y triglicéridos en plasma, cuyo efecto sobre la hiperglucemia fue similar a la restricción de la dieta [112]. Un estudio mecánico reveló que se mejoró la expresión génica de la hormona hepática, el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), que debería funcionar para mejorar el gasto de ácidos grasos y glucosa. De hecho, beber agua con hidrógeno estimuló el metabolismo energético, medido por el consumo de O<sub>2</sub> y la espiración de CO<sub>2</sub>. Estos resultados sugieren el beneficio potencial del H<sub>2</sub> para mejorar la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico [112].

## 7.6. Prevención de efectos adversos por un fármaco antitumoral

El cisplatino es un fármaco anticancerígeno ampliamente utilizado en el tratamiento de una amplia gama de tumores; sin embargo, su aplicación está limitada por causar nefrotoxicidad, que puede estar mediada por estrés oxidativo [113]. La inhalación de hidrógeno gaseoso (1% H<sub>2</sub> en el aire) o beber agua hidrogenada mejoró la mortalidad y la pérdida de peso corporal causadas por el cisplatino y alivió la nefrotoxicidad. El consumo de agua hidrogenada mejoró la metamorfosis que acompaña a la disminución de la apoptosis en el riñón. A pesar de sus efectos protectores contra el cisplatino inducido

toxicidad, el H<sub>2</sub> no perjudicó la actividad antitumoral del cisplatino contra las líneas de células cancerosas in vitro y en ratones portadores de tumores in vivo. Así, el H<sub>2</sub>, ya sea gas hidrógeno o agua hidrógeno, podría mejorar la calidad de vida de los pacientes durante la quimioterapia [99]. Este hallazgo fue confirmado por otro grupo [114].

## 7.7. Reacciones antialérgicas

Utilizando un modelo de ratón, se demostró que beber agua con hidrógeno podría atenuar una reacción alérgica de tipo inmediato al suprimir la fosforilación de Lyn asociado con FcRI y sus moléculas de señalización aguas abajo, lo que posteriormente inhibía la actividad de la NADPH oxidasa y reducía la generación de peróxido de hidrógeno [115]. Estos hallazgos implican que los efectos beneficiosos de H<sub>2</sub> no solo se imparten por su actividad de eliminación de radicales, sino también por la modulación de una vía de señalización específica.

## 7.8. Efectos sobre el trasplante

ROS contribuye al desarrollo de fibrosis intersticial y atrofia tubular que se observa en la nefropatía crónica por aloinjerto. El grupo de Nakao probó el efecto del tratamiento con agua hidrogenada en un modelo de trasplante de riñón, en el que se trasplantaron ortotópicamente aloinjertos de ratas Lewis en receptores Brown Norway que se habían sometido a nefrectomía bilateral. Beber agua hidrogenada mejoró la función del aloinjerto, ralentizó la progresión de la nefropatía crónica del aloinjerto, redujo la lesión oxidante y la producción de mediadores inflamatorios, y mejoró la supervivencia general. Las vías de señalización inflamatoria, como las proteínas quinasas activadas por mitógenos, se activaron menos en los aloinjertos renales de ratas tratadas con agua hidrogenada en comparación con las ratas tratadas con agua normal. Por lo tanto, el agua hidrogenada oral es un agente antioxidante y antiinflamatorio eficaz que reduce la nefropatía crónica del injerto y mejora la supervivencia de los injertos renales de rata [116].

## 7.9. Otros

Se ha demostrado que beber agua con hidrógeno previene la formación de superóxido en cortes de cerebro de ratones knockout para SMP30/GNL con agotamiento de vitamina C [117], que el H<sub>2</sub> en el agua potable atenúa la pérdida de audición inducida por ruido en conejillos de Indias [118], que beber agua con hidrógeno mejora el deterioro cognitivo en ratones con senescencia acelerada [119], y que el H<sub>2</sub> exhibe efectos cardioprotectores potenciales en ratones irradiados [120].

## 8. MÉTODOS DE INGESTA DE HIDRÓGENO III: INYECCIÓN DE HIDRÓGENO SALINO

### 8.1. Ventaja de la inyección

Aunque la administración oral es segura y conveniente, el H<sub>2</sub> en el agua tiende a escaparse con el tiempo y parte del H<sub>2</sub> se pierde en el estómago o el intestino, lo que dificulta el control de la concentración de H<sub>2</sub> administrado. La administración de H<sub>2</sub> a través de una línea de solución de hidrógeno inyectable (solución salina disuelta con H<sub>2</sub>) puede permitir la administración de concentraciones más precisas de H<sub>2</sub> [121].

### 8.2. Efectos de la solución salina de hidrógeno en varios modelos de enfermedades

El grupo de Sun administró solución salina saturada con H<sub>2</sub> mediante inyección peritoneal a varios animales modelo con gran éxito. Por lo tanto, la solución salina de hidrógeno tiene potencial en el tratamiento clínico real. Por ejemplo, la inyección de solución salina de hidrógeno mostró efectos neuroprotectores en un modelo de rata con hipoxia-isquemia neonatal [121]. Además, se aplicó solución salina H<sub>2</sub> a un modelo de ratón con enfermedad de Alzheimer, que se generó mediante inyección intracerebroventricular del péptido A1-42. El tratamiento con H<sub>2</sub> disminuyó el nivel de estrés oxidativo y los marcadores de inflamación y previno la disfunción de la memoria y la disfunción motora, respectivamente [122].

Ellos y otros grupos han demostrado efectos en muchas enfermedades. modelos de facilidad, como se publica en los siguientes informes [123-130].

## 9. MÉTODOS DE INGESTA DE HIDRÓGENO IV: ABSORCIÓN DIRECTA DE HIDRÓGENO

### 9.1. Mejora del modelo de glaucoma

Alternativamente, se prepararon gotas para los ojos cargadas con H<sub>2</sub> disolviendo H<sub>2</sub> en solución salina y administrándolas directamente en la superficie ocular [131, 132].

En el glaucoma agudo de los ojos, la elevación transitoria de la presión intraocular provoca reducciones significativas en el grosor de la retina por lesión por isquemia-reperfusión mediada por la generación de especies reactivas de oxígeno [133]. La aplicación directa de gotas para los ojos que contienen H<sub>2</sub> mejoró la lesión por isquemia-reperfusión de la retina en un modelo de rata. Cuando se administraron continuamente colirios de H<sub>2</sub>, la concentración de H<sub>2</sub> aumentó en el cuerpo vítreo y el nivel de •OH disminuyó durante la isquemia-reperfusión retiniana. Las gotas oculares H<sub>2</sub> redujeron el número de células positivas para marcador de estrés oxidativo y apoptótico 1 día después de la lesión por isquemia-reperfusión, y redujeron el adelgazamiento de la retina con la activación concomitante de la glía de Müller, los astrocitos y la microglía a los 7 días después de la lesión por isquemia-reperfusión, mejorando la recuperación del grosor de la capa retiniana interna a >70 %.

Además, diseñamos gotas para los ojos con H<sub>2</sub> disuelto para administrar H<sub>2</sub> directamente a la retina, y monitoreamos el curso temporal de los cambios en los niveles de H<sub>2</sub> utilizando un electrodo sensor de hidrógeno en forma de aguja insertado a través de la esclerótica hasta el cuerpo vítreo en ratas. El H<sub>2</sub> pudo llegar al cuerpo vítreo mediante la administración de H<sub>2</sub> saturado en solución salina normal. Cuando se administraron gotas oculares de H<sub>2</sub> de forma continua, se detectó aproximadamente un 70 % de H<sub>2</sub> en la superficie ocular. Dos minutos después del inicio de la administración, la concentración de H<sub>2</sub> en el cuerpo vítreo comenzó a aumentar y alcanzó un nivel máximo después de 15 min. En ese momento, la concentración de H<sub>2</sub> era de aproximadamente el 20 % del H<sub>2</sub> en las gotas para los ojos. La concentración máxima de H<sub>2</sub> en el cuerpo vítreo alcanzó aproximadamente un tercio del valor observado en la superficie ocular [131].

### 9.2. Hydrogen Bath H<sub>2</sub>

penetra fácilmente en la piel y se distribuye por todo el cuerpo a través del flujo sanguíneo. Por lo tanto, tomar un baño de agua tibia con H<sub>2</sub> disuelto es un método para incorporar H<sub>2</sub> al cuerpo en la vida diaria, especialmente en Japón. Se tarda solo 10 minutos en distribuirse por todo el cuerpo, a juzgar por la medición del gas hidrógeno al expirar (resultados no publicados).

## 10. MÉTODOS DE INGESTA DE HIDRÓGENO V: AUMENTO DE HIDRÓGENO INTESTINAL

### 10.1. Producción de hidrógeno en bacterias intestinales

Otros gases médicos, CO, NO y H<sub>2</sub>S, son generados por sistemas enzimáticos endógenos. El desarrollo farmacéutico ha aprovechado estos sistemas para diseñar moléculas exógenas que simulen las generadas endógenamente; sin embargo, los mamíferos carecen de su propia enzima para producir H<sub>2</sub> [70].

En lugar de sistemas enzimáticos endógenos, la producción espontánea de gas hidrógeno en el cuerpo humano ocurre a través de la fermentación de carbohidratos no digeridos por la flora enterobacteriana residente [134]. El H<sub>2</sub> se transfiere a la circulación portal y se excreta a través de la respiración en cantidades significativas [135]. Por esta razón, la medición de los niveles de H<sub>2</sub> en el aire espirado se usa para detectar la malabsorción de carbohidratos [76]; sin embargo, ha habido pocos estudios sobre la función fisiológica del hidrógeno derivado del tracto gastrointestinal. gas como antioxidante.

### 10.2. ¿Son los inhibidores de la -glucosidasa un antioxidante indirecto?

-Los inhibidores de la glucosidasa son agentes farmacológicos que reducen específicamente la hiperglucemia posprandial mediante el retraso de la digestión de los disacáridos, lo que reduce la absorción de glucosa. Un ensayo epidemiológico a gran escala ha demostrado que el tratamiento de pacientes con intolerancia a la glucosa con una -glucosidasa

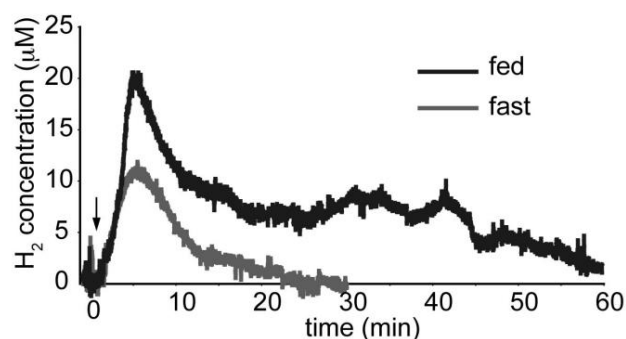
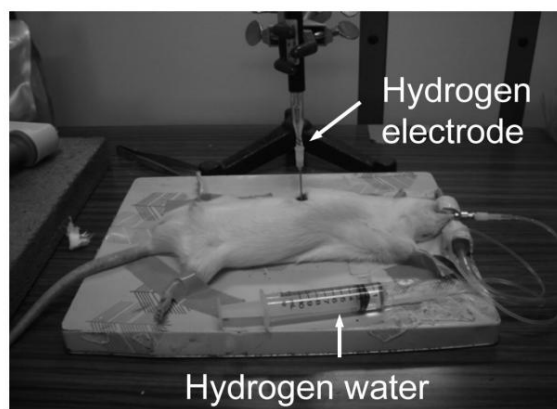


Figura 2). Medida de la acumulación de H<sub>2</sub> en hígado de rata.

La concentración de H<sub>2</sub> en el hígado se controló utilizando un sensor de hidrógeno tipo aguja insertado en el hígado de ratas alimentadas o en ayunas durante la noche. La rata recibió agua hidrogenada (H<sub>2</sub> 0,8 mM en agua) por vía oral mediante sonda gástrica a 15 ml/kg. La flecha indica el momento en el que se administró agua con hidrógeno a la rata.

inhibidor se asoció con una reducción del 25 % en el riesgo de progresión a diabetes, una reducción del 34 % en el riesgo de desarrollar hipertensión de novo y una reducción del 49 % en el riesgo de eventos cardiovasculares [136]. Además, un metanálisis de siete estudios a largo plazo sugirió que la acarbosa redujo el riesgo de infarto de miocardio en pacientes con diabetes tipo 2 [137]. Tal reducción del riesgo de eventos de enfermedad coronaria en pacientes con diabetes tipo 2 no se observó mediante un mejor control glucémico logrado mediante un tratamiento intensivo con insulina y glibenclámda [138]. En realidad, la acarbosa, que es un inhibidor de la -glucosidasa, incrementó notablemente la producción de H<sub>2</sub> en voluntarios. Por lo tanto, proponemos que el H<sub>2</sub> producido por las bacterias intestinales actúa como un antioxidante único y previene eventos cardiovasculares [139].

### 10.3. Efectos antiinflamatorios de las bacterias intestinales a través del hidrógeno

Escherichia coli puede producir una cantidad considerable de H<sub>2</sub> catalizando con hidrogenasa. Kawai et al. examinó si H<sub>2</sub> liberada de bacterias colonizadas intestinalmente podría afectar la hepatitis de ratón inducida por concana valina A. La reconstitución de la flora intestinal con E. coli productora de H<sub>2</sub>, pero no con E. coli mutante deficiente en hidrogenasa, reguló negativamente la inflamación hepática inducida por concanavalina A. Estos resultados indican que el H<sub>2</sub> liberado por las bacterias intestinales puede suprimir la inflamación [140]. El H<sub>2</sub> también interviene en la supresión de la inflamación del colon inducida por el sulfato sódico de dextrano [141].

### 10.4. Otros

La cúrcuma dietética indujo la producción de H<sub>2</sub> de las bacterias intestinales [142], y se demostró que la lactulosa es un antioxidante indirecto que mejora la enfermedad inflamatoria intestinal [143].

11. PRUEBAS CLÍNICAS

Varios grupos han iniciado exámenes clínicos. Las pruebas clínicas han revelado que beber agua con hidrógeno redujo los marcadores de estrés oxidativo en pacientes con diabetes tipo 2 [144] o sujetos con síndrome metabólico potencial [145] e influyó en el metabolismo de la glucosa [144] y el colesterol [145].

La hemodiálisis con solución de diálisis con H2 redujo significativamente los niveles de proteína 1 quimioatrayente de monocitos plasmáticos y mieloperoxidasa [146].

12. REGULACIÓN DE LAS EXPRESIONES GENÉTICAS Y FOSFORILACIONES DE PROTEÍNAS

Se ha informado que H2 actúa como un regulador antiinflamatorio y antialérgico al inducir citocinas inflamatorias e inhibir factores de señal fosforilantes, respectivamente; sin embargo, no se han identificado los factores de transcripción y las quinasas involucradas en los efectos proporcionados por Hc .

H2 disminuyó las expresiones de factores proinflamatorios, incluidos TNF-, IL-6, IL-1, CCL2 e IL-10, TNF-, IL-12, ICAM-1 [85], HMGB-1 [147], NF-B [148], PGE2 y PGE2 [54].

Además, H2 regulaba hacia arriba o hacia abajo los factores involucrados en la apoptosis hacia la inhibición de la apoptosis: H2 suprimió el

expresiones de factores proapoptóticos, que incluyen casapasa 3 [92, 149] y caspasa 12 [92], caspasa 8 [86] y BAX [86]. Por el contrario H2 estimuló las expresiones de los factores antiapoptóticos de Bcl-2 y Bcl-xL [86].

H2 está involucrado en la regulación de varios factores; regulación positiva de PCNA, bFGF, HGF, IFN- y regulación negativa de i-NOS [87] y VEGF [54].

Como contribuyente de la transducción de señales, el H2 inhibió las horilaciones de fosfato de algunas proteínas señalizadoras, incluidas MEK, p38, ERK, JNK [116] y Lyn, Syk, PLC1, 2, Akt, ERK1/2, JNK, p38, cPLA2, ASK1, IB [115].

La hemooxigenasa-1 (HO-1), una enzima microsomal que degrada el hemo a monóxido de carbono, hierro libre y biliverdina, participa en la defensa celular contra el estrés oxidativo y se ha especulado que es un nuevo objetivo terapéutico [150]. En particular, el H2 modula la expresión de HO-1, que comúnmente está regulada por estos gases médicos [48, 151]. Además, H2 aumentó la expresión de FGF21, que es un regulador del metabolismo energético [112].

Como preguntas esenciales, se desconoce cómo H2 regula las expresiones génicas y las fosforilaciones, y si las regulaciones de transcripción y fosforilación anteriores son la causa o la consecuencia de los efectos de H2. El principal objetivo molecular de H2 sigue siendo desconocido.

Tabla 1. Enfermedades y estados fisiológicos para los que se notifican los efectos del hidrógeno clasificados por órganos diana [152].

Enfermedad/Fisiología	Especies	Fuente de H2	Referencia
Cerebro			
Infarto cerebral	roedor	gas	[12]
Superóxido en el cerebro	roedor	agua	[117]
Hipoxia cerebral neonatal	roedor	gas	[92]
	roedor	salina	[131]
	cerdo	gas	[94]
Demencia inducida por restricción	roedor	agua	[98]
enfermedad de alzheimer	roedor	salina	[122]
Demencia senil	roedor	agua	[119]
enfermedad de Parkinson	roedor	agua	[103, 104]
Infarto cerebral hemorrágico	roedor	gas	[93]
Lesión cerebral traumática	roedor	gas	[95]
Médula espinal			
Lesión de la médula espinal	roedor	salina	[130]
Ojo			
Glaucoma	roedor	gotas para los ojos	[131]
Quemadura corneal por álcali	roedor	gotas para los ojos	[132]
Oreja			
Alteración de la audición	roedor	medio	[50]
	roedor	gas	[97]
	roedor	agua	[118]

(Cuadro 1) Continuación....

Enfermedad/Fisiología	Especies	Fuente de H2	Referencia
Pulmón			
Lesión pulmonar inducida por oxígeno	roedor	salina	[128, 129]
Trasplante de pulmón	roedor	gas	[86]
Corazón			
Infarto de miocardio	roedor	gas	[58]
	roedor	salina	[149]
Trasplante de corazón	roedor	gas	[87]
Lesión cardíaca inducida por irradiación	roedor	agua	[120]
Hígado			
isquemia hepática	roedor	gas	[84]
Hepatitis	roedor	bacterias	[140]
Ictericia obstructiva	roedor	salina	[124]
Riñón			
nefropatía por cisplatino	roedor	gasolina, agua	[99]
	roedor	agua	[114]
Hemodiálisis	humano	diálisis	[146]
Trasplante de riñón	roedor	agua	[116]
Páncreas			
Pancreatitis aguda	roedor	salina	[148]
Intestino			
injerto intestinal	roedor	gas	[85]
	roedor	salina	[125, 130]
Colitis ulcerosa	roedor	gas	[141]
Vaso sanguíneo			
aterosclerosis	roedor	agua	[110]
Metabolismo			
Diabetes mellitus tipo 2	humano	agua	[144]
Síndrome metabólico	humano	agua	[145]
Obesidad/Diabetes	roedor	agua	[112]
Inflamación y alergia			
Alergia tipo I	roedor	agua	[115]
Septicemia	roedor	gas	[90]
Inflamación inducida por Zymosan	roedor	gas	[91]
Otros			
Células estromales multipotentes	células	medio	[54]
lesión por radiación	células, roedor	medio	[52]



13. OBSERVACIONES DE CIERRE: CUESTIONES POR DISOLUCIÓN EN EL FUTURO

En nuestro primer informe publicado en 2007, indicamos que el H2 reaccionaba con especies de oxígeno/nitrógeno fuertemente reactivas, incluidas •OH y ONOO– en reacciones sin células. Las células cultivadas en medio rico en H2 estaban protegidas contra el estrés oxidativo por la actividad depuradora de •OH del H2, dependiendo de la disminución de •OH [12]; sin embargo, la evidencia reciente muestra que la propiedad depuradora no es la única explicación de los potentes efectos beneficiosos del H2. Cuando los animales modelo y los sujetos humanos consumieron H2 bebiendo agua con H2 disuelto, incluso una cantidad muy pequeña de H2 fue muy eficaz. Puede ser difícil explicar que la reducción directa de •OH por una cantidad muy pequeña de H2 revele todas las funciones de H2, porque el nivel de saturación de H2 es solo 0.8 mM y el tiempo de permanencia de •OH es muy corto en el cuerpo.

Recientemente hemos demostrado que el H2 se puede acumular con el glucógeno hepático; este hallazgo indica la posible acumulación de H2 en una región específica; sin embargo, es poco probable que la cantidad de H2 es suficiente para exhibir todas sus funciones [112]. Además, se demostró que beber H2 0,04 o 0,08 mM es eficaz [104, 112]. La cantidad de H2 administrado parece ser, en muchos casos, independiente de la magnitud de los efectos. Las bacterias intestinales producen más de 1 litro de hidrógeno gaseoso al día, mientras que la cantidad de H2 que se origina al beber agua con hidrógeno es inferior a 50 ml. No obstante, el H2 adicional en el agua potable con hidrógeno es inequívocamente eficaz.

Muchos temas adicionales de la terapia con hidrógeno, incluidos los mecanismos moleculares que subyacen a los marcados efectos de una cantidad muy pequeña de H2 , siguen sin resolverse. El principal objetivo molecular de H2 permanece desconocido. Aunque H2 regula varias expresiones génicas y fosforilaciones de proteínas, no está claro si tales regulaciones son la causa o la consecuencia de los efectos contra el estrés oxidativo. Una de las preguntas abiertas es cómo H2 involucra la interacción entre la antioxidación, la antiinflamación y la antialergia. Por lo tanto, no debería ser justo clasificar los roles de H2 por efectos externos en esta etapa.

Finalmente, el autor resume los informes que muestran los efectos de H2 por la clasificación de los órganos diana (Tabla 1) [152].

DIVULGACIÓN

El autor declara no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

[1] Wallace CC. Un paradigma mitocondrial de enfermedades metabólicas y degenerativas, envejecimiento y cáncer: un amanecer para la medicina evolutiva. *Annu Rev. Genet* 2005; 39: 359-407.

[2] Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, Visioli O. La aparición de estrés oxidativo durante la reperfusión en animales de experimentación y hombres. *Fármacos cardiovasculares Ther* 1991; 5 Suplemento 2: 277-87.

[3] Andersen JK. Estrés oxidativo en la neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Nat Med* 2004; 10 Suplemento: S18-25.

[4] Ohta S, Ohsawa I. Disfunción de las mitocondrias y el estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer: sobre defectos en el complejo de citocromo c oxidasa y desintoxicación de aldehídos. *J Alzheimers Dis* 2006; 9: 155-66.

[5] Ohta S, Ohsawa I, Kamino K, Ando F, Shimokata H. La deficiencia mitocondrial de ALDH2 como estrés oxidativo. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1011: 36-44.

[6] Chang JC, Kou SJ, Lin WT, Liu CS. Papel regulador de las mitocondrias en el estrés oxidativo y la aterosclerosis. *Mundo J Cardiol* 2010; 2: 150-9.

[7] Finkel T, Holbrook NJ. Oxidantes, el estrés oxidativo y la biología del envejecimiento. *Naturaleza* 2000; 408: 239-47.

[8] Steinhubl SR. ¿Por qué los antioxidantes han fallado en los ensayos clínicos? *Am J Cardiol* 2008; 101: 14D-9D.

[9] Hercberg S, Kesse-Guyot E, Druesne-Pecollo N, et al. Incidencia de cánceres, enfermedades cardiovasculares isquémicas y mortalidad durante 5-seguimiento de un año después de suspender las vitaminas y minerales antioxidantes

suplementos: un seguimiento postintervención en el Estudio SU.VI.MAX. *Int J Cáncer* 2010; 127: 1875-81.

[10] Brambilla D, Mancuso C, Scuderi MR, et al. El papel del suplemento antioxidante en los trastornos del sistema inmunitario, neoplásicos y neurodegenerativos: un punto de vista para una evaluación del perfil de riesgo/beneficio. *Nutr J* 2008; 7: 29.

[11] Hackam DG. Revisión: los suplementos antioxidantes para la prevención primaria y secundaria no disminuyen la mortalidad. *ACP J Club* 2007; 147: 4.

[12] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. El hidrógeno actúa como un antioxidante terapéutico al reducir selectivamente los radicales de oxígeno citotóxicos. *Nat Med* 2007; 13: 688-94.

[13] Salganik RI. Los beneficios y peligros de los antioxidantes: control de la apoptosis y otros mecanismos de protección en pacientes con cáncer y la población humana. *Mermelada. Col. Nutr* 2001; 20: 464S-72S; discusión 73S-75S.

[14] Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Especies reactivas de oxígeno como mensajeros intracelulares durante el crecimiento y la diferenciación celular. *Célula. Fisiol. bioquímica* 2001; 11: 173-86.

[15] Liu H, Colavitti R, Rovira, II, Finkel T. Regulación transcripcional dependiente de redox. *Circ. Resolución* 2005; 97: 967-74.

[16] Harma M, Harma M, Erel O. Medición de biomarcadores de estrés oxidativo en plasma en medicina deportiva. *Eur J Appl Physiol* 2006; 97: 505; respuesta del autor 6-8.

[17] Tanriverdi H, Evrengul H, Kuru O, et al. El estrés oxidativo inducido por el tabaquismo puede afectar la función endotelial y el flujo sanguíneo coronario en arterias coronarias angiográficamente normales. *Circo J* 2006; 70: 593-9.

[18] Grassi D, Desideri G, Ferri L, Aggio A, Tiberti S, Ferri C. Estrés oxidativo y disfunción endotelial: ¿di no al tabaquismo! *Curr Pharm Des* 2010; 16: 2539-50.

[19] Agarwal R. Tabaquismo, estrés oxidativo e inflamación: impacto en el gasto energético en reposo en la nefropatía diabética. *BMC Nephrol* 2005; 6: 13.

[20] Turrens JF. Formación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno. *J Physiol* 2003; 552: 335-44.

[21] Lin MT, Beal MF. Disfunción Mitocondrial y estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas. *Naturaleza* 2006; 443: 787-95.

[22] Halliwell B, Gutteridge JM. Generación de radicales hidroxilo dependientes de iones metálicos biológicamente relevantes. Una actualización. *FEBS Lett* 1992; 307: 108-12.

[23] Peled-Kamar M, Lotem J, Wirguin I, Weiner L, Hermalin A, Groner Y. El estrés oxidativo media el deterioro de la función muscular en ratones transgénicos con niveles elevados de superóxido dismutasa de Cu/Zn de tipo salvaje. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3883-7.

[24] Chan PH, Epstein CJ, Li Y, et al. Ratones transgénicos y mutantes knockout en el estudio del estrés oxidativo en daño cerebral. *J Neurotrauma* 1995; 12: 815-24.

[25] Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, et al. La sobreexpresión de tioredoxina humana en ratones transgénicos controla el estrés oxidativo y la esperanza de vida. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 693-6.

[26] Stefanova N, Reindl M, Neumann M, et al. El estrés oxidativo en ratones transgénicos con sobreexpresión de alfa-sinucleína oligodendroglial replica la neuropatología característica de la atrofia multisistémica. *Am J Pathol* 2005; 166: 869-76.

[27] Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extensión de la vida útil murina por sobreexpresión de catalasa dirigida a las mitocondrias. *Ciencia* 2005; 308: 1909-11.

[28] Stockl P, Zankl C, Hutter E, et al. El desacoplamiento parcial de la fosforilación oxidativa induce senescencia prematura en fibroblastos humanos y células madre de levadura. *Radicales Libres Biol Med* 2007; 43: 947-58.

[29] Jia JJ, Zhang X, Ge CR, Jois M. Los polimorfismos de los genes UCP2 y UCP3 asociados con el metabolismo de las grasas, la obesidad y la diabetes. *ObesRev* 2009; 10: 519-26.

[30] Jia JJ, Tian YB, Cao ZH, et al. Los polimorfismos de los genes UCP1 asociados con el metabolismo de las grasas, la obesidad y la diabetes. *mol. Biol. representante* 2010; 37: 1513-22.

[31] Giacco F, Brownlee M. Estrés oxidativo y complicaciones diabéticas. *Circ. Resolución* 2010; 107: 1058-70.

[32] Ohsawa I, Nishimaki K, Murakami Y, Suzuki Y, Ishikawa M, Ohta S. Neurodegeneración dependiente de la edad que acompaña a la pérdida de memoria en ratones transgénicos defectuosos en la actividad de la aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial. *J. Neurosci* 2008; 28: 6239-49.

[33] Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, et al. La remodelación metabólica inducida por el estrés del aldehído mitocondrial estimula

tolerancia al estrés oxidativo en el corazón. *Circo Res* 2009; 105: 1118-27

[34] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Estrés oxidativo, inflamación y cáncer: ¿cómo se relacionan? *Radicales Libres Biol Med* 2010; 49: 1603-16.

[35] Vaziri ND, Rodríguez-Iturbe B. Mecanismos de enfermedad: estrés oxidativo e inflamación en la patogenia de la hipertensión. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006; 2: 582-93.

[36] Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, et al. Reducción marcada de la generación de radicales libres y la disfunción contráctil por la terapia antioxidante iniciada en el momento de la reperfusión. Evidencia de que el "aturdimiento" miocárdico es una manifestación de lesión por reperfusión. *Circ Res* 1989; 65: 607-22.

[37] Zweier JL. Medición de radicales libres derivados del superóxido en el corazón reperfundido. Evidencia de un mecanismo de radicales libres de lesión por reperfusión. *J Biol Chem* 1988; 263: 1353-7.

[38] Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB. Demostración de la generación de radicales libres en el miocardio "aturdido" de perros intactos con el uso de la trampa de giro alfa-fenil N-terc-butil nitrona. *J Clin Invest* 1988; 82: 476-85.

[39] Vanden Hoek T, Becker LB, Shao ZH, Li CQ, Schumacker PT. El preconditionamiento en los cardiomiocitos protege al atenuar el estrés oxidativo en la reperfusión. *Circ Res* 2000; 86: 541-8.

[40] Halliwell B, Gutteridge JM. Radicales libres de oxígeno y hierro en relación con la biología y la medicina: algunos problemas y conceptos. *Arco. Bioquímica Biophys* 1986; 246: 501-14.

[41] Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. El papel de las mitocondrias en la protección del corazón mediante el preconditionamiento. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767: 1007-31.

[42] Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser RR, Rothbaum DA, Burwell LR, George BS, Kereiakes DJ, Deitchman D, Gustafson N, et al. La superóxido dismutasa humana recombinante (h-SOD) no logra mejorar la recuperación de la función ventricular en pacientes sometidos a angioplastia coronaria por infarto agudo de miocardio. *Circulación* 1994; 89: 1982-91.

[43] Richard VJ, Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. La terapia para reducir los radicales libres durante la reperfusión temprana no limita el tamaño de los infartos de miocardio causados por 90 minutos de isquemia en perros. *Circulación* 1988; 78: 473-80.

[44] Ristow M, Zarse K. Cómo el aumento del estrés oxidativo promueve la longevidad y la salud metabólica: el concepto de hormesis mitocondrial (mitohormesis). *Exp Gerontol* 2010; 45: 410-8.

[45] Ristow M, Zarse K, Oberbach A, et al. Los antioxidantes previenen los efectos beneficiosos para la salud del ejercicio físico en humanos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 8665-70.

[46] Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, et al. La cardioprotección inducida después del acondicionamiento requiere señalización a través de un mecanismo sensible a redox, canal de K<sup>+</sup> sensible a ATP mitocondrial y activación de proteína quinasa C. *Res. Básica Cardiol* 2006; 101: 180-9.

[47] Downey JM, Cohen MV. Una observación realmente radical: un comentario sobre Penna et al. en *Basic Res Cardiol* (2006) 101:180-189. *Res. Básica Cardiol* 2006; 101: 190-1.

[48] Huang CS, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A. Avances recientes en la investigación del hidrógeno como gas médico terapéutico. *Radic Res Res* 2010; 44: 971-82.

[49] Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Desarrollo de nuevas sondas de fluorescencia que pueden detectar de forma fiable especies reactivas de oxígeno y distinguir especies específicas. *J Biol Chem* 2003; 278: 3170-5.

[50] Kikkawa YS, Nakagawa T, Horie RT, Ito J. El hidrógeno protege las células ciliadas auditivas de los radicales libres. *Neuroinforme* 2009; 20: 689-94.

[51] Taura A, Kikkawa YS, Nakagawa T, Ito J. El hidrógeno protege las células ciliadas vestibulares de los radicales libres. *Acta Otolaryngol Suppl* 2010: 95-100.

[52] Qian L, Cao F, Cui J, et al. Efecto radioprotector del hidrógeno en células cultivadas y ratones. *Radic Res Res* 2010; 44: 275-82.

[53] Schoenfeld MP, Ansari RR, Zakrajsek JF, et al. La terapia de hidrógeno puede reducir los riesgos relacionados con el estrés oxidativo inducido por la radiación en los vuelos espaciales. *Hipótesis Med* 2011; 76: 117-8.

[54] Kawasaki H, Guan J, Tamama K. El tratamiento con gas hidrógeno prolonga la vida replicativa de las células estromales multipotenciales de la médula ósea in vitro al tiempo que preserva la diferenciación y los potenciales paracrinos. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397: 608-13.

[55] Murphy MP, Smith RA. Entrega de fármacos a las mitocondrias: la clave de la medicina mitocondrial. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 41: 235-50.

[56] Murphy MP. Orientación selectiva de compuestos bioactivos para mitocondrias *Tendencias Biotecnología* 1997; 15: 326-30.

[57] Smith RA, Murphy MP. Antioxidantes dirigidos a las mitocondrias como terapias. *Disco Med* 2011; 11: 106-14.

[58] Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, et al. La inhalación de gas hidrógeno reduce el tamaño del infarto en el modelo de rata de lesión por reperfusión de isquemia miocárdica. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 30-5.

[59] Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortalidad en ensayos aleatorizados de suplementos antioxidantes para prevención primaria y secundaria: revisión sistemática y metanálisis. *JAMA* 2007; 297: 842-57.

[60] Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Suplementos antioxidantes para la prevención de la mortalidad en participantes sanos y pacientes con diversas enfermedades. *Base de datos Cochrane Syst Rev* 2008: CD007176.

[61] Gray SL, Anderson ML, Crane PK, et al. Uso de suplementos vitamínicos antioxidantes y riesgo de demencia o enfermedad de Alzheimer en adultos mayores. *J Am Geriatr Soc* 2008; 56: 291-5.

[62] Walker C. Los suplementos antioxidantes no mejoran la mortalidad y pueden causar daño. *Am Fam Médico* 2008; 78: 1079-80.

[63] Bjelakovic G, Gluud C. Suplementos antioxidantes sobrevivientes. *J. Natl. Instituto del Cáncer* 2007; 99: 742-3.

[64] Miller ER, 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Metanálisis: la suplementación con dosis altas de vitamina E puede aumentar la mortalidad por todas las causas. *Ana. Interno. Med* 2005; 142: 37-46.

[65] Mandal CC, Ganapathy S, Gorin Y, et al. Las especies reactivas de oxígeno derivadas de Nox4 median la transcripción del gen BMP2 y la diferenciación de osteoblastos. *Biochem J* 2010; 433: 393-402.

[66] Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Las especies de oxígeno reactivo mitocondrial desencadenan la transcripción inducida por hipoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11715-20.

[67] Carriere A, Carmona MC, Fernández Y, et al. Las especies de oxígeno reactivo mitocondrial controlan el factor de transcripción CHOP 10/GADD153 y la diferenciación de adipocitos: un mecanismo para el efecto dependiente de la hipoxia. *J Biol Chem* 2004; 279: 40462-9.

[68] Winterbourn CC. Reactividad biológica y biomarcadores del oxidante de neutrófilos, ácido hipocloroso. *Toxicología* 2002; 181-182: 223-7.

[69] Murad F. Descubrimiento de algunos de los efectos biológicos del óxido nítrico y su papel en la señalización celular. *Biosci. representante* 2004; 24: 452-74.

[70] Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, Yamamoto T, Suematsu M. Interacciones de múltiples sistemas de transducción de gases: características e incertidumbres de la biología de los gases CO, NO y H<sub>2</sub>S. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 157-92.

[71] Motterlini R, Otterbein LE. El potencial terapéutico del monóxido de carbono. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 728-43.

[72] Kimura H. Sulfuro de hidrógeno: del cerebro al intestino. *antioxidante redox Señal* 2010; 12: 1111-23.

[73] Szabo C. Sulfuro de hidrógeno y su potencial terapéutico. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 917-35.

[74] Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, et al. El sulfuro de hidrógeno atenúa la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica mediante la preservación de la función mitocondrial. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 15560-5.

[75] Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R. Uso de monóxido de carbono como agente terapéutico: promesas y desafíos. *Cuidados Intensivos Med* 2008.

[76] Kobayashi A, Ishikawa K, Matsumoto H, Kimura S, Kamiyama Y, Maruyama Y. Antioxidante sinérgico y acción vasodilatadora del monóxido de carbono en la hipertrofia cardíaca inducida por angiotensina II. *Hipertensión* 2007; 50: 1040-8.

[77] Bloch KD, Ichinose F, Roberts JD, Jr., Zapol WM. El NO inhalado como agente terapéutico. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 339-48.

[78] Abraini JH, Gardette-Chauffour MC, Martinez E, Rostain JC, Lemaire C. Reacciones psicofisiológicas en humanos durante una inmersión en mar abierto a 500 m con una mezcla de hidrógeno, helio y oxígeno. *J Appl Physiol* 1994; 76: 1113-8.

[79] Lillo RS, Parker CE, Porter WR. Comparación de descompresión de helio e hidrógeno en ratas. *J Appl Physiol* 1997; 82: 892-901.

[80] Lillo RS, Parker EC. Modelo de mezcla de gases para predecir la enfermedad por descompresión en ratas. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2107-16.

[81] Fontanari P, Badier M, Guillot C, et al. Cambios en el rendimiento máximo de los músculos esqueléticos e inspiratorios durante y después

la inmersión humana récord de 7,1 MPa Hydra 10. Eur J Appl Physiol 2000; 81: 325-8.

[82] Peters O, Back T, Lindauer U, et al. Aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno después de la oclusión permanente y reversible de la arteria cerebral media en la rata. J Cereb Blood Flow Metab 1998; 18: 196-205.

[83] Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Especies reactivas de oxígeno durante la lesión por reflujo de isquemia en hígado de rata perfundido aislado. J. Clin. invertir 1988; 81: 1240-6.

[84] Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. La inhalación de hidrógeno gaseoso suprime el daño hepático causado por isquemia/reperusión al reducir el estrés oxidativo. Biochem Biophys Res Commun 2007; 361: 670-4.

[85] Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, et al. La inhalación de hidrógeno mejora el estrés oxidativo en la lesión del injerto intestinal inducida por trasplante. Am J Trasplante 2008; 8: 2015-24.

[86] Kawamura T, Huang CS, Tochigi N, et al. Prevención de la terapia con gas de hidrógeno inhalado de la lesión por isquemia/reperusión inducida por trasplante de pulmón en ratas. Trasplante 2010; 90: 1344-51.

[87] Nakao A, Kaczorowski DJ, Wang Y, et al. Mejoría de la lesión por isquemia fría/ reperusión cardíaca en ratas con hidrógeno o monóxido de carbono inhalados, o ambos. J Corazón Pulmón Trasplante 2010; 29: 544-53.

[88] Huang CS, Kawamura T, Lee S, et al. La inhalación de hidrógeno mejora la lesión pulmonar inducida por el ventilador. Cuidado crítico 2010; 14: R234.

[89] Victor VM, Espulgues JV, Hernandez-Mijares A, Rocha M. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en la sepsis: una terapia potencial con antioxidantes dirigidos a las mitocondrias. Infect Disord Drug Targets 2009; 9: 376-89.

[90] Xie KL, Yu YH, Pei YP, et al. Efectos protectores del gas hidrógeno en la sepsis polimicrobiana murina mediante la reducción del estrés oxidativo y la liberación de HMGB1. Choque 2010; 34: 90-7.

[91] Xie K, Yu Y, Zhang Z, et al. El gas hidrógeno mejora la tasa de supervivencia y el daño orgánico en el modelo de inflamación generalizada inducida por zymosan. Choque 2010; 34: 495-501.

[92] Cai J, Kang Z, Liu WW, et al. La terapia de hidrógeno reduce la apoptosis en el modelo de rata con hipoxia-isquemia neonatal. Neurosci Lett 2008; 441: 167-72.

[93] Chen CH, Manaenko A, Zhan Y, Liu WW, Ostrowski RP, Tang J, Zhang JH. El gas hidrógeno redujo la transformación hemorrágica potenciada por hiperglucemia aguda en un modelo de rata con isquemia focal. Neurociencia 2010; 169: 402-14.

[94] Domoki F, Olah O, Zimmermann A, et al. El hidrógeno es neuroprotector y preserva la reactividad cerebrovascular en cerdos recién nacidos asfixiados. Pediatr Res 2010; 68: 387-92.

[95] Ji X, Liu W, Xie K, et al. Efectos beneficiosos del gas hidrógeno en un modelo de rata de lesión cerebral traumática mediante la reducción del estrés oxidativo. Cerebro Res 2010; 1354: 196-205.

[96] Huang Y, Xie K, Li J, et al. Efectos beneficiosos del gas hidrógeno contra la lesión por isquemia-reperusión de la médula espinal en conejos. Cerebro Res 2011; 1378: 125-36.

[97] Taura A, Kikkawa YS, Nakagawa T, Ito J. El hidrógeno protege las células ciliadas vestibulares de los radicales libres. Acta Otorrinolaringol. (Stockh) 2010; 130: 95-100.

[98] Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. El consumo de hidrógeno molecular previene las deficiencias inducidas por el estrés en las tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo durante la restricción física crónica en ratones. Neuropsicofarmacología 2009; 34: 501-8.

[99] Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. El hidrógeno molecular alivia la nefrotoxicidad inducida por un fármaco contra el cáncer, el cisplatino, sin comprometer la actividad antitumoral en ratones. Cancer Chemother Pharmacol 2009; 64: 753-61.

[100] Liu J, Wang X, Shigenaga MK, Yeo HC, Mori A, Ames BN. El estrés por inmovilización causa daño oxidativo a los lípidos, las proteínas y el ADN en el cerebro de las ratas. FASEBJ 1996; 10: 1532-8.

[101] Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Neurogénesis adulta: de los precursores a la red y la fisiología. Physiol Rev 2005; 85: 523-69.

[102] Schapira AH. Las mitocondrias en la etiología y patogenia de Enfermedad de Parkinson. Lancet Neurol 2008; 7: 97-109.

[103] Fu Y, Ito M, Fujita Y, et al. El hidrógeno molecular protege contra la degeneración nigroestriatal inducida por 6-hidroxidopamina en un modelo de rata de la enfermedad de Parkinson. Neurosci Lett 2009; 453: 81-5.

[104] Fujita K, Seike T, Yutsudo N, et al. El hidrógeno en el agua potable reduce la pérdida neuronal dopaminérgica en el modelo de ratón 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina de la enfermedad de Parkinson. PLoS Uno 2009; 4: e7247.

[105] Victor VM, Apostolova N, Herance R, Hernandez-Mijares A, Rocha M. Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en la aterosclerosis: antioxidantes dirigidos a las mitocondrias como terapia potencial. Curr Med Chem 2009; 16: 4654-67.

[106] Stocker R, Keaney JF, Jr. Papel de las modificaciones oxidativas en la aterosclerosis. Fisiol. Rev 2004; 84: 1381-478.

[107] Upston JM, Kritharides L, Stocker R. El papel de la vitamina E en la aterosclerosis. prog. Res de lípidos 2003; 42: 405-22.

[108] Hodis HN, Mack WJ, LaBree L, et al. La suplementación con alfa-tocoferol en individuos sanos reduce la oxidación de lipoproteínas de baja densidad pero no la aterosclerosis: el Estudio de Prevención de la Aterosclerosis con Vitamina E (VEAPS). Circulación 2002; 106: 1453-9.

[109] Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Kokkinos DV. Modelos knockout de apolipoproteína E. Curr Pharm Des 2008; 14: 338-51.

[110] Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. El consumo de agua hidrogenada previene la aterosclerosis en ratones knockout para apolipoproteína E. Biochem Biophys Res Commun 2008; 377: 1195-8.

[111] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Aumento del estrés oxidativo en la obesidad y su impacto en el síndrome metabólico. J Clin Invest 2004; 114: 1752-61.

[112] Kamimura N, Nishimaki K, Ohsawa I, Ohta S. El hidrógeno molecular mejora la obesidad y la diabetes al inducir FGF21 hepático y estimular el metabolismo energético en ratones db/db. Obesidad (Silver Spring) 2011. en prensa.

[113] Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatino nefrotoxicidad: a review. Am J Med Sci 2007; 334: 115-24.

[114] Kitamura A, Kobayashi S, Matsushita T, Fujinawa H, Murase K. Verificación experimental del efecto protector del agua rica en hidrógeno contra la nefrotoxicidad inducida por cisplatino en ratas utilizando TC dinámica con contraste. Hermano J. Radiol 2010; 83: 509-14.

[115] Itoh T, Fujita Y, Ito M, et al. El hidrógeno molecular suprime la transducción de señales mediada por FcεpsilonRI y previene la desgranulación de los mastocitos. Biochem Biophys Res Commun 2009; 389: 651-6.

[116] Cardenal JS, Zhan J, Wang Y, et al. El agua hidrogenada oral previene la nefropatía crónica por aloinjerto en ratas. Riñón Int 2010; 77: 101-9.

[117] Sato Y, Kajiyama S, Amano A, et al. El agua pura rica en hidrógeno previene la formación de superóxido en cortes de cerebro de ratones knockout SMP30/GNL sin vitamina C. Biochem Biophys Res Commun 2008; 375: 346-50.

[118] Lin Y, Kashio A, Sakamoto T, Suzukawa K, Kakigi A, Yamasoba T. El hidrógeno en el agua potable atenúa la pérdida auditiva inducida por el ruido en cobayas. Neurosci Lett 2011; 487: 12-6.

[119] Gu Y, Huang CS, Inoue T, Yamashita T, Ishida T, Kang KM, Nakao A. Beber agua de hidrógeno mejoró el deterioro cognitivo en ratones acelerados por la senescencia. Revista de Bioquímica Clínica y Nutrición 2010; 46: 269-76.

[120] Qian LR, Cao F, Cui JG, et al. Los efectos cardioprotectores potenciales del hidrógeno en ratones irradiados. J. Radiat. Res. (Tokio) 2010; 51: 741-7.

[121] Cai JM, Kang ZM, Liu K, et al. Efectos neuroprotectores de la solución salina de hidrógeno en el modelo de rata con hipoxia-isquemia neonatal. Cerebro Res 2009; 1256: 129-37.

[122] Li J, Wang C, Zhang JH, Cai JM, Cao YP, Sun XJ. La solución salina rica en hidrógeno mejora la función de la memoria en un modelo de rata de la enfermedad de Alzheimer inducida por beta amiloide mediante la reducción del estrés oxidativo. Cerebro Res 2010; 1328: 152-61.

[123] Chen C, Chen Q, Mao Y, et al. La solución salina rica en hidrógeno protege contra la lesión de la médula espinal en ratas. Neurochem Res 2010; 35: 1111-8.

[124] Liu Q, Shen WF, Sun HY, et al. La solución salina rica en hidrógeno protege contra el daño hepático en ratas con ictericia obstructiva. Hígado Int 2010; 30: 958-68.

[125] Mao YF, Zheng XF, Cai JM, et al. La solución salina rica en hidrógeno reduce la lesión pulmonar inducida por la isquemia/reperusión intestinal en ratas. Biochem Biophys Res Commun 2009; 381: 602-5.

[126] Qian L, Cao F, Cui J, et al. Los posibles efectos cardioprotectores del hidrógeno en ratones irradiados. J Radiat Res (Tokio) 2010; 51: 741-7.

- [127] Shingu C, Koga H, Hagiwara S, Matsumoto S, Goto K, Yokoi I, Noguchi T. La solución salina rica en hidrógeno atenúa la lesión por isquemia-reperfusión renal. *J Anesth* 2010; 24: 569-74.
- [128] Sun Q, Cai J, Liu S, Liu Y, Xu W, Tao H, Sun X. La solución salina rica en hidrógeno brinda protección contra la lesión pulmonar hiperóxica. *J Surg Res* 2011; 165: e43-9.
- [129] Zheng J, Liu K, Kang Z, et al. La solución salina saturada de hidrógeno protege el pulmón contra la toxicidad del oxígeno. *Submarino Hyperb Med* 2010; 37: 185-92.
- [130] Zheng X, Mao Y, Cai J, et al. La solución salina rica en hidrógeno protege contra la lesión por isquemia/reperfusión intestinal en ratas. *Radic Res Res* 2009; 43: 478-84.
- [131] Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, et al. Protección de la retina por difusión rápida de hidrógeno: administración de gotas para los ojos cargadas de hidrógeno en la lesión por isquemia-reperfusión retiniana. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 487-92.
- [132] Kubota M, Shimura S, Kubota S, et al. El hidrógeno y la N-acetil L-cisteína rescatan la angiogénesis inducida por el estrés oxidativo en un modelo de quemadura por álcali en la córnea de un ratón. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52: 427-33.
- [133] Nakabayashi M. Revisión de la hipótesis de isquemia para la hipertensión ocular distinta del glaucoma congénito y el glaucoma de ángulo cerrado. *Oftalmológica* 2004; 218: 344-9.
- [134] Thauer RK, Jungermann K, Decker K. Conservación de energía en bacterias anaerobias quimioprotólicas. *Bacteriol Rev* 1977; 41: 100-80.
- [135] Levitt MD. Producción y excreción de gas hidrógeno en el hombre. *NORTE. ingl. J. Med* 1969; 281: 122-7.
- [136] Chasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. El tratamiento con acarbose y el riesgo de enfermedad cardiovascular e hipertensión en pacientes con intolerancia a la glucosa: el ensayo STOP-NIDDM. *JAMA* 2003; 290: 486-94.
- [137] Hanefeld M, Cagatay M, Petrowitsch T, Neuser D, Petzinna D, Rupp M. La acarbose reduce el riesgo de infarto de miocardio en pacientes con diabetes tipo 2: metanálisis de siete estudios a largo plazo. *EUR. Corazón J* 2004; 25: 10-6.
- [138] Control intensivo de glucosa en sangre con sulfonilureas o insulina en comparación con el tratamiento convencional y el riesgo de complicaciones en pacientes con diabetes tipo 2 (UKPDS 33). Grupo de Estudio Prospectivo de Diabetes del Reino Unido (UKPDS). *Lancet* 1998; 352: 837-53.
- [139] Suzuki Y, Sano M, Hayashida K, Ohsawa I, Ohta S, Fukuda K. ¿Los efectos de los inhibidores de la alfa-glucosidasa en los eventos cardiovasculares están relacionados con niveles elevados de gas hidrógeno en el tracto gastrointestinal? *FEBS Lett* 2009; 583: 2157-9.
- [140] Kajiya M, Sato K, Silva MJ, et al. El hidrógeno de las bacterias intestinales protege contra la hepatitis inducida por Concanavalina A. *Bioquímica Biografía. Res. común* 2009; 386: 316-21.
- [141] Kajiya M, Silva MJ, Sato K, Ouhara K, Kawai T. El hidrógeno media la supresión de la inflamación del colon inducida por el sulfato de sodio de dextrano. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386: 11-5.
- [142] Shimouchi A, Nose K, Takaoka M, Hayashi H, Kondo T. Efecto de la cúrcuma dietética sobre el hidrógeno del aliento. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1725-9.
- [143] Chen X, Zuo Q, Hai Y, Sun XJ. Lactulosa: un antioxidante indirecto que mejora la enfermedad inflamatoria intestinal al aumentar la producción de hidrógeno. *Hipótesis Med* 2011; 76: 325-7.
- [144] Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, et al. 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. *NutrRes* 2008; 28: 137-43.
- [145] Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie N. Eficacia del 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: 140-9.
- [146] Nakayama M, Nakano H, Hamada H, Itami N, Nakazawa R, Ito S. Un novedoso sistema de hemodiálisis bioactivo que utiliza dihidrógeno disuelto (H2) producido por electrólisis del agua: un ensayo clínico. *nefrol. Marcar. Trasplante* 2010; 25: 3026-33.
- [147] Xie K, Yu Y, Pei Y, Hou L, Chen S, Xiong L, Wang G. Efectos protectores del gas hidrógeno en la sepsis polimicrobiana murina mediante la reducción del estrés oxidativo y la liberación de HMGB1. *Choque* 2010; 34: 90-7.
- [148] Chen H, Sun YP, Li Y, et al. La solución salina rica en hidrógeno mejora la gravedad de la pancreatitis aguda inducida por L-arginina en ratas. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393: 308-13.
- [149] Sun Q, Kang Z, Cai J, et al. La solución salina rica en hidrógeno protege el miocardio contra la lesión por isquemia/reperfusión en ratas. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234: 1212-9.
- [150] Jazwa A, Cuadrado A. Orientación de la hemooxigenasa-1 para la neuroprotección y la neuroinflamación en enfermedades neurodegenerativas. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 1517-31.
- [151] Park DJ, Agarwal A, George JF. Expresión de hemo oxigenasa-1 en subpoblaciones de células dendríticas murinas: efecto sobre la diferenciación de células dendríticas CD8+ in vivo. *Am J Pathol* 2010; 176: 2831-9.
- [152] Ohta S, Nakao A, Ohno K. El simposio de hidrógeno molecular médico de 2011: un simposio inaugural de la revista Medical Gas Research. *Investigación de gases medicinales* 2011; 1: 10.