

# Efecto del agua rica en hidrógeno sobre el estrés oxidativo, la función hepática y la carga viral en pacientes con hepatitis B crónica

Chun Xiang Xia<sup>1</sup>, DM 1,3†, Wenwu Liu<sup>2</sup>, Doctor. 3,†, Dongxiao Zeng, BA 1, Liyao Zhu<sup>2</sup>, BA 2, sol de Xiaoli, BA 2 y Xuejun Sun<sup>3</sup>, Doctor. 3

## Resumen

**Objetivo:** Investigar los efectos del agua rica en hidrógeno (HRW) sobre el estrés oxidativo, la función hepática y el ADN del VHB en pacientes con hepatitis B crónica (HCB).

**Métodos:** Sesenta pacientes con CHB fueron asignados al azar al grupo de tratamiento de rutina o al grupo de tratamiento con hidrógeno en el que los pacientes recibieron tratamiento de rutina solo o HRW oral adicional (1200–1800 ml/día, dos veces al día), respectivamente, durante 6 semanas consecutivas. El estrés oxidativo sérico, la función hepática y el nivel de ADN del VHB se detectaron antes y después del tratamiento. Treinta sujetos sanos sirvieron como controles.

**Resultados:** Cuando se comparó con los controles, el estrés oxidativo fue evidente en los pacientes con CHB y la función hepática también se vio significativamente afectada. Después del tratamiento, el estrés oxidativo se mantuvo sin cambios en el grupo de tratamiento de rutina, pero mejoró notablemente en el grupo de tratamiento con hidrógeno. La función hepática mejoró significativamente y el ADN del VHB se redujo notablemente después de los tratamientos correspondientes. Aunque se notó una diferencia significativa en el estrés oxidativo entre dos grupos después del tratamiento, la función hepática y el nivel de ADN del VHB fueron comparables después del tratamiento y ambos tenían tendencias mejoradas.

**Conclusión:** HRW atenúa significativamente el estrés oxidativo en pacientes con CHB, pero se requieren más estudios con tratamiento a largo plazo para confirmar el efecto de HRW sobre la función hepática y el nivel de ADN del VHB. Clin Trans Sci 2013; Volumen 6: 372–375

**Palabras clave:** agua rica en hidrógeno, estrés oxidativo, Función del hígado, hepatitis B crónica, la carga viral

## Introducción

La hepatitis B es una infección hepática potencialmente mortal causada por el virus de la hepatitis B (VHB) y un importante problema de salud mundial y el tipo más grave de hepatitis viral. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, se estima que dos mil millones de personas se han infectado con el VHB en todo el mundo y más de 240 millones tienen infecciones hepáticas crónicas.

Unas 600.000 personas mueren cada año debido a las consecuencias agudas o crónicas de la hepatitis B. La hepatitis B es endémica en China y otras partes de Asia.

<sup>1</sup> Hay alrededor de 93 millones de pacientes con infección crónica

por VHB, de los cuales 20 millones presentan hepatitis B crónica (CHB) en China. 2

Sin embargo, la patogenia de la hepatitis aún no se conoce bien. Hasta la fecha, se ha descubierto que el estrés oxidativo desempeña un papel importante en la patogenia de la hepatitis. 3,4 Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la peroxidación lipídica inducida por ROS (LPO) están involucradas en la patología de la hepatitis viral y se han considerado como una de las principales causas de daño hepático. 3-5 Los estudios han confirmado el desequilibrio redox en los pacientes con CHB.

En 2007, Ohsawa et al. descubrió que el hidrógeno actúa como un antioxidante terapéutico al reducir selectivamente los radicales de oxígeno citotóxicos, incluido el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). 7

En estudios previos, se encontró que la inhalación de hidrógeno y la administración intraperitoneal y oral de agua rica en hidrógeno ejercen efectos protectores en numerosos modelos animales, incluida la lesión por isquemia/reperfusión y la inflamación en muchos órganos. 7-9 Sin embargo, el efecto protector del hidrógeno

sobre la inflamación inducida por virus, incluida la hepatitis, no se ha informado hasta el momento.

Este estudio tuvo como objetivo investigar el efecto del agua rica en hidrógeno sobre el estrés oxidativo (superóxido dismutasa [SOD]; glutatión S transferasa [GST]; xantina oxidasa [XOD]; malondialdehído [MDA]), función hepática (alanina

aminotransferasa [ALT]; ácido biliar total [Tbil]; colinesterasa [ChE]) y la carga de VHB en pacientes con HCC. Este estudio puede proporcionar evidencia para la aplicación clínica de agua rica en hidrógeno en el tratamiento de CHB.

## Sujetos y métodos

### Colección de sujetos

Treinta sujetos sanos (25 hombres, 5 mujeres) para el examen físico de rutina fueron reclutados como controles. No tenían enfermedades del sistema que afectarían los órganos importantes, incluidos el corazón, el hígado, los riñones y los pulmones. La función hepática y renal era normal, y no tenían hepatitis viral o no eran portadores de hepatitis viral. La edad media fue de  $35,8 \pm 12,2$  años (rango: 20-55 años).

**Criterios de inclusión:** Se reclutaron pacientes hospitalizados con HCC moderada ( $n = 60$ ) entre agosto de 2010 y septiembre de 2010. Hubo 49 hombres y 11 mujeres. Estos pacientes fueron asignados aleatoriamente al grupo de tratamiento con hidrógeno o al grupo de tratamiento de rutina ( $n = 30$  por grupo). El diagnóstico de HCC se basó en la Guía para la prevención y el tratamiento de la hepatitis B crónica. 2

**Criterios de exclusión:** Se excluyeron hepatitis A, C, D y E, hepatitis alcohólica, hepatitis inducida por fármacos y hepatitis autoinmune. Se excluyeron tumores, enfermedades hematológicas, cardiopatías, hipertensión, hipertiroidismo, diabetes, embarazo, cirrosis hepática y trastornos neuropsiquiátricos. En el grupo de tratamiento de rutina había 24 hombres y 6 mujeres con una edad media de  $36,8 \pm 15,2$  años; en el grupo de tratamiento con hidrógeno había 25 hombres y 5 mujeres con una edad media de  $35,3 \pm 11,1$  años. Este fue un estudio controlado, aleatorizado y ciego. Todo el protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Popular de Forth de Huai'an, y se obtuvo el consentimiento informado por escrito antes del estudio.

<sup>1</sup> Centro de Laboratorio Clínico del Hospital Popular de Forth de Huai'an, Jiangsu, 223002 China; <sup>2</sup> Porcelana; <sup>3</sup> Departamento de Hepatología del Cuarto Hospital Popular de Huai'an, Jiangsu, 223002, China; <sup>3</sup> Departamento de Medicina de Buceo, Segunda Universidad Médica Militar, Shanghai, † Xia CX y 200422, Porcelana

Liu WW contribuyeron igualmente a este trabajo.

Correspondencia: XJ Sun (sunxjk@hotmail.com)

DOI: 10.1111/cts.12076

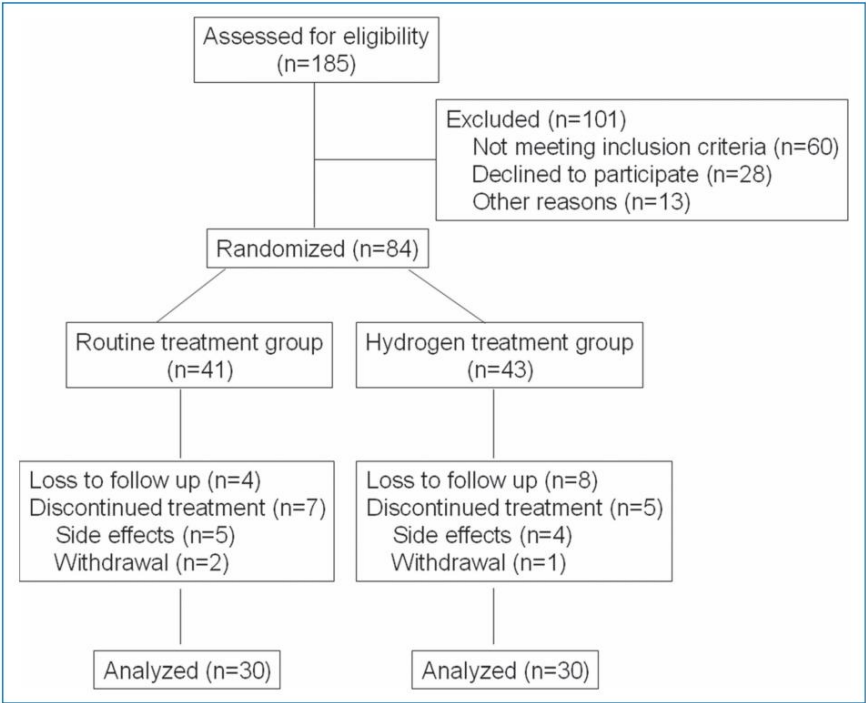


Figura 1. Diagrama de flujo del reclutamiento de pacientes.

Tratamiento

En el grupo de tratamiento de rutina, los pacientes recibieron tratamiento de rutina y se administró agua sin hidrógeno a los pacientes en los puntos de tiempo designados. En el grupo de tratamiento con hidrógeno, además del tratamiento de rutina, se administró agua rica en hidrógeno por vía oral tres veces al día (8 a 9 a. m.; 14 a 15 p. m.; 18 a 19 p. m.) durante 6 semanas consecutivas (1200 a 1800 ml al día). 9

Todos los sujetos no fueron tratados con otros antioxidantes dentro de 1 semana antes del estudio. La sangre venosa en ayunas (4 ml) se recogió por la mañana antes y después del tratamiento de 6 semanas. Después de la centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos, el suero se recogió y almacenó a -70 °C para su uso posterior.

Preparación de agua rica en hidrógeno

El agua rica en hidrógeno se produjo colocando una barra de magnesio metálico en agua potable ( $Mg + 2H_2O \rightarrow Mg(OH)_2 + H_2$ ); concentración final de hidrógeno: 0,55 ~ 0,65 mM). La barra de magnesio contenía 99,9 % de magnesio metálico puro y piedras naturales en un recipiente de polipropileno y cerámica. 9,10

Detecciones

Se utilizó el método XOD para detectar la actividad SOD, se realizó detección química colorimétrica para detectar GST y XOD,

y se empleó análisis colorimétrico con ácido tiobarbitúrico para la detección de MDA. Los reactivos se adquirieron de Nanjing Jiancheng Biotech Co., Ltd (Nanjing, China) y las detecciones se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real Se realizó una PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real para medir el ADN del VHB (20120114; Da'an Gene Biotech Co., Ltd, Guangzhou, China) con un termociclador (ABI 5700; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). El límite inferior de detección fue de 10 copias/mL.

La detección de la función hepática ALT, Tbil y ChM se midieron con un analizador bioquímico automático (TBA 120R; Toshiba, Tokio, Japón) y los reactivos (No: 12125) se compraron a Whiteman Biotech Co., Ltd. (Nanjing, China). La detección se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico El análisis estadístico se realizó con SPSS versión 16.0 (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.) para Windows. Los datos cuantitativos se expresaron como media ±

desviación estándar (x ± s). Las comparaciones entre los tres grupos se realizaron con análisis de varianza, seguido de una prueba post hoc con la prueba de Newman-Keuls. Sin embargo, las comparaciones entre el grupo de tratamiento con hidrógeno y el grupo de tratamiento de rutina se realizaron con la prueba t. Los datos cualitativos se expresaron como porcentaje y se probaron con la prueba de chi-cuadrado. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p < 0,05.

Resultados

Características de los pacientes al inicio del estudio en dos grupos Se reclutó un total de 185 pacientes con BCC, de los cuales 101 cumplían los criterios de inclusión. Luego, 84 pacientes fueron asignados aleatoriamente al grupo de tratamiento de rutina (n = 41) y al grupo de tratamiento con hidrógeno (n = 43). Al final del estudio, se incluyeron 30 pacientes en el grupo de tratamiento de rutina y 30 pacientes en el grupo de tratamiento con hidrógeno para el análisis final (Figura 1). Las características de los pacientes con CHB se muestran en la Tabla 1. No hubo diferencias marcadas en el sexo, la edad, la tasa de HBeAg positivo, la ALT y el nivel de ADN del VHB al inicio entre el grupo de tratamiento de rutina y el grupo de tratamiento con hidrógeno. Además, no hubo diferencias marcadas en la demografía al inicio entre los controles y los pacientes con BCC.

Grupo	Sexo (M/F)	Edad (año)	AgHBe (%)	ALTERNATIVA (U/L)	ADN del VHB (lg copias/mL)
Tratamiento de rutina	24/6	36,8 ± 15,2	60,0%	210,1 ± 90,0	5,55 ± 2,08
Tratamiento de hidrógeno	25/5	35,3 ± 11,1	63,3%	220,5 ± 95,0	5,07 ± 1,93
pag	0.738	0.5435	0.790	0.633	0.260

Tabla 1. Características de los pacientes con BCC al inicio del estudio en el grupo de tratamiento de rutina y en el grupo de tratamiento con hidrógeno.

Grupo		SOD (U/mL)	GST (U/mL)	MDA (nmol/mL)	XOD (U/L)
Control		98,1 ± 11,8	99,4 ± 7,8	4,4 ± 1,1	12,9 ± 2,1
Tratamiento de rutina	Antes	84,6 ± 6,5a ,b	93,4 ± 9,2a ,b	7,4 ± 2,6 a, b	16,4 ± 2,2a ,b
	Después	84,9 ± 11,1a ,b	94,6 ± 9,2a ,b	6,6 ± 1,4a ,b	16,8 ± 1,8a ,b
Tratamiento de hidrógeno	Antes	84,9 ± 8,2a ,b	93,6 ± 9,3a ,b	7,2 ± 2,6 a,b	16,9 ± 2,6 a,b
	Después	106,8 ± 10,7a	109,6 ± 9,6a	4,8 ± 2,7	15,3 ± 1,7 a

Note.a p < 0,05 frente al grupo control  
b p < 0,05 versus después del tratamiento con hidrógeno

Tabla 2. Parámetros de estrés oxidativo antes y después del tratamiento en diferentes grupos (x ± s).

Grupo		ALTERNATIVA (U/L)	TbIL (μ mol/L)	Che (KU/L)	ADN del VHB (lg copias/mL)
Control		24,4 ± 23,2	12,3 ± 4,8	7,8 ± 1,4	Indetectable
Tratamiento de rutina	Antes	210,1 ± 90,0	45,5 ± 21,0	6,7 ± 1,5	5,55 ± 2,08
	Después	68,0 ± 38,6 a	22,5 ± 25,3 a	7,2 ± 1,4 a	4,88 ± 2,60
Tratamiento de hidrógeno	Antes	220,5 ± 95,0	34,9 ± 33,9	6,7 ± 1,5	5,07 ± 1,93
	Después	54,8 ± 34,6 a	16,7 ± 9,6 a	7,7 ± 1,4 a	3,89 ± 1,52a

Nota: un p < 0,05 versus antes del tratamiento.

Tabla 3. Función hepática y ADN del VHB antes y después del tratamiento en diferentes grupos (x ± s).

Cambios en los parámetros relacionados con el estrés oxidativo en diferentes grupos

Como se muestra en la Tabla 2, se encontraron diferencias significativas en SOD, GST, MDA y XOD entre sujetos sanos y pacientes con CHB antes y después del tratamiento (p < 0,01). Estos parámetros permanecieron sin cambios en los sujetos sanos y en el grupo de tratamiento de rutina. Además, las actividades de SOD y GST aumentaron significativamente y la actividad de MDA y XOD disminuyó drásticamente después del tratamiento con hidrógeno en comparación con antes del tratamiento (p < 0,01). Además, después del tratamiento, las actividades de SOD y GST aumentaron significativamente y la MDA y la XOD disminuyeron notablemente en el grupo de tratamiento con hidrógeno en comparación con el grupo de tratamiento habitual (p < 0,01). Cabe destacar que las actividades de SOD y GST después del tratamiento con agua rica en hidrógeno fueron más altas que las de los controles.

Función hepática y ADN del VHB antes y después del tratamiento en dos grupos

Como se muestra en la Tabla 3, la ALT, TBiL y ChE en los pacientes con CHB fueron significativamente diferentes de las de los sujetos sanos antes del tratamiento.

En los pacientes con CHB, la ALT y la TBiL se redujeron y la ChE aumentó significativamente después de los tratamientos (p < 0,01 o 0,05). En comparación con el grupo de tratamiento de rutina, la función hepática se mantuvo relativamente sin cambios en el grupo de tratamiento con hidrógeno (p > 0,05), aunque la ALT y TBiL se redujeron ligeramente y la ChE aumentó ligeramente. Después del tratamiento, el ADN del VHB en el grupo de tratamiento con hidrógeno fue comparable al del grupo de tratamiento habitual (p > 0,05), aunque el ADN del VHB se redujo hasta cierto punto en el grupo de tratamiento con hidrógeno.

## Discusión

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento de agua rica en hidrógeno podría mejorar el estrés oxidativo en pacientes con CHB y el hígado.

función, así como la carga de ADN del VHB habían mejorado las tendencias después de la terapia integral que contiene hidrógeno.

En CHB, los mecanismos que subyacen a la lesión de los hepatocitos son complicados e implican inflamación y lesión inducida por el sistema inmunitario en las que las ERO desempeñan un papel importante. 11,12 Las ROS incluyen el anión superóxido, el oxígeno singlete, los radicales hidroxilo y otros. Se ha descubierto que las ROS y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) se atribuyen a la lesión hepática en una variedad de enfermedades hepáticas, incluida la hepatitis viral. 4 Los estudios han demostrado que el estrés oxidativo (ROS, RNS) aumentó pero la capacidad antioxidante se vio comprometida en pacientes con hepatitis C. 4,6 Además, los pacientes con hepatitis C tienen un aumento de LPO en el suero, el hígado y las células mononucleares periféricas, y el GSH se reduce pero el GSSG aumenta en el suero y el hígado. 5,6,13 En diferentes etapas patológicas, la extensión de la LPO también es diferente y se ha encontrado que está relacionada con la patogénesis de la hepatitis B. 14,15 Estos hallazgos confirman que el estrés oxidativo es un contribuyente importante en la patogénesis de la hepatitis viral, que también se confirmó en este estudio como aumentos en XOD y MDA (un producto de LPO) y disminuciones en las actividades de SOD y GST. Dado que existe un desequilibrio oxidativo/antioxidativo en pacientes con hepatitis viral, mejorar el estrés oxidativo puede convertirse en una estrategia prometedora para el tratamiento de la hepatitis viral.

Aunque se han identificado numerosos antioxidantes (incluyendo antioxidantes naturales y sintéticos), no hay consenso en la aplicación de antioxidantes en el tratamiento de la hepatitis B, 16,17 y algunos de los antioxidantes tienen posibles efectos nocivos.

Además, en animales con enfermedades hepáticas o daño hepático, la baja biodisponibilidad de los agentes orales sigue siendo un desafío. 17 Por lo tanto, es imperativo desarrollar antioxidantes sin o con efectos secundarios mínimos para el tratamiento clínico de la hepatitis B.

Recientemente, se ha confirmado que el hidrógeno posee una potente capacidad antioxidante en numerosas enfermedades relacionadas con la oxidación. 19 En 2007, Ohsawa et al. 7 por primera vez encontró ese

18

el hidrógeno podría neutralizar selectivamente el  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{ONOO}^-$ , dos los radicales libres son críticos para la lesión tisular y no tuvieron influencia sobre otros radicales libres. Como antioxidante ideal, el hidrógeno tiene algunas ventajas: puede penetrar las biomembranas y difundirse en el citosol, las mitocondrias y el núcleo y, por lo tanto, puede proteger el ADN nuclear y las mitocondrias; el producto del hidrógeno es agua y el uso de hidrógeno no debería tener efectos secundarios no deseados graves; el hidrógeno es lo suficientemente suave como para no perturbar las reacciones metabólicas de oxidación/reducción o interrumpir las ROS involucradas en la señalización celular. Además, la recogida de hidrógeno es relativamente fácil, lo que hace que el tratamiento con hidrógeno sea económico.

Además, los pacientes que recibieron tratamiento con hidrógeno tuvieron mejores tendencias en la función hepática y el nivel de ADN del VHB en comparación con los pacientes que recibieron tratamiento de rutina, aunque no hubo diferencias significativas. Esto podría atribuirse al tratamiento a corto plazo con hidrógeno. Por lo tanto, se requiere más estudio con tratamiento a largo plazo con agua rica en hidrógeno para confirmar el efecto protector del hidrógeno sobre la función hepática y su efecto supresor sobre la replicación viral.

En conjunto, el agua rica en hidrógeno puede atenuar el estrés oxidativo y tiene el potencial de mejorar la función hepática y reducir el nivel de ADN del VHB en pacientes con CHB. Se requieren más estudios con tratamiento a largo plazo de agua rica en hidrógeno y un tamaño de muestra grande para confirmar el efecto hepatoprotector del hidrógeno en pacientes con hepatitis.

#### Agradecimientos Este

estudio fue apoyado por la Fundación Nacional de Ciencias Naturales de China (No. 81000493/H0906) y Young Projection of Shanghai Municipal Health Bureau (No: 2010Y0503).

#### Referencias 1.

Organización Mundial de la Salud. Hepatitis B. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> (consultado el 18 de diciembre de 2012).

- Rama de Hepatología y Enfermedades Infecciosas de la Asociación Médica China. Guía para la Prevención y Tratamiento de la Hepatitis B Crónica (2010). *J Clin Hepatol*. 2011; 14 (2): 81 – 89.
- Waris G, Ahsan H. Especies reactivas de oxígeno: papel en el desarrollo del cáncer y diversas afecciones crónicas. *J Carcinog*. 2006; 5: 14.
- Muriel P. Papel de los radicales libres en las enfermedades hepáticas. *Hepatol Int*. 2009; 3 (4): 526 – 536.
- Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della Libera G, Marafin C, Lecis E, Burra P, Floreani A, Cecchetto A, Naccarato R. Almacenamiento de hierro, peroxidación de lípidos y recambio de glutatión en hepatitis crónica anti-VHC positiva. *J Hepatol*. 1995; 22 (4): 449 – 456.
- Higado de Jeque MI, Choi J. Regulación redox de la hepatitis C en no alcohólicos y alcohólicos. *Seronello. Radic Libre Biol Med*. 2007; 43 (6): 869 – 882.
- 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 reactivos. *Nat Med*. 2007; 13 (6): 688 – 694.
- Cai J, Kang Z, Liu K, Liu W, Li R, Zhang JH, Luo X, Sun X. Efectos neuroprotectores de la solución salina con hidrógeno en el modelo de rata con hipoxia-isquemia neonatal. *Res. cerebral*. 2009; 1256: 129 – 137.
- Kang KM, Kang YN, Choi IB, Gu Y, Kawamura T, Toyoda Y, Nakao A. Efectos de beber agua rica en hidrógeno sobre la calidad de vida de los pacientes tratados con radioterapia por tumores hepáticos. *Res. de gas médico* 2011; 1: 11.
- 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 (2): 140 – 149.
- Lee WM. Inmunidad celular y humoral en la hepatitis viral. *Soy J. Clin Pathol*. 1976; 65 (5 suplementos): 866 – 869.
- Yu Y, Gong R, Mu Y, Chen Y, Zhu C, Sun Z, Chen M, Liu Y, Zhu Y, Wu J. El virus de la hepatitis B induce una nueva red de inflamación que involucra tres factores inflamatorios, IL-29, IL-8 y ciclooxigena se-2. *J Immunol*. 2011; 187 (9): 4844 – 4860.
- Swietek K, Juszczak J. Reducción de la concentración de glutatión en eritrocitos de pacientes con hepatitis viral aguda y crónica. *J hepatitis viral*. 1997; 4 (2): 139 – 141.
- Tasdelen Fisgin N, Aydin BK, Sarikaya H, Tanyel E, Esen S, Sunbul M, Leblebicioglu H. Estrés oxidativo y defensa antioxidante en pacientes con hepatitis B crónica. *Laboratorio Clin*. 2012; 58 (3–4): 273 – 280.
- Bolukbas C, Bolukbas FF, Horoz M, Aslan M, Celik H, Erel O. Aumento del estrés oxidativo asociado con la gravedad de la enfermedad hepática en diversas formas de infección por el virus de la hepatitis B. *BMC Infect Dis*. 2005; 5: 95.
- Enfermedad, Moreno Otero R. Base fisiopatológica de la terapia antioxidante en el hígado crónico de Medina J. *drogas* 2005; 65 (17): 2445 – 2461.
- Singal AK, Jampana SC, Liver, Weinman SA. Los antioxidantes como agentes terapéuticos para la enfermedad hepática. *Int*. 2011; 31 (10): 1432 – 1448.
- Villanueva C, KrossRD. Estrés inducido por antioxidantes. *Int J Mol Sci*. 2012; 13 (2): 2091 – 2109.
- Estudios, Chen S, Zhang JM. El hidrógeno como antioxidante selectivo: una revisión de la clínica y experimentales de Hong Y. *J Int Med Res*. 2010; 38 (6): 1893 – 1903.