

Artículo de investigación

El efecto de beber agua de hidrógeno en Dermatitis atópica inducida por *Dermatophagoides farinae* Alérgeno en ratones NC/Nga

Rosa Mística C. Ignacio,¹ Hyun-Suk Kwak,² Young-Uk Yun,² Ma. Easter Joy V. Sajo,¹ Yang-Suk Yoon,¹ Cheol-Su Kim,³ Soo-Ki Kim,³ y Kyu-Jae Lee¹

¹ Departamento de Biología Médica Ambiental, Facultad de Medicina de Wonju, Universidad de Yonsei, Wonju, Gangwon 220-701, República de Corea

² Equipo de soluciones ECO, Centro de I+D de comunicaciones y medios digitales, Samsung Electronics Co., Ltd., Suwon, Gyeonggi 443-742, República de Corea

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina de Wonju, Universidad de Yonsei, Wonju, Gangwon 220-701, República de Corea

La correspondencia debe dirigirse a Kyu-Jae Lee; medbio9@gmail.com

Recibido el 13 de septiembre de 2013; Revisado el 28 de octubre de 2013; Aceptado el 5 de noviembre de 2013

Editor académico: KB Harikumar

Copyright © 2013 Rosa Mística C. Ignacio et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se cite correctamente el trabajo original.

El agua de hidrógeno (HW) producida por electrólisis del agua tiene características de valor de potencial de oxidación-reducción (ORP) extremadamente bajo y alto hidrógeno disuelto (DH). Se ha demostrado que tiene varios efectos beneficiosos, incluidos efectos antioxidantes y antiinflamatorios; sin embargo, el efecto de HW sobre la dermatitis atópica (DA), un trastorno inflamatorio de la piel, está poco documentado. En el presente estudio, examinamos el efecto inmunológico de beber HW en la piel similar a la EA inducida por *Dermatophagoides farinae* en ratones NC/Nga. A los ratones se les administró HW y agua purificada (PW) durante 25 días. Evaluamos la concentración sérica de proinflamatorios (TNF-), Th1 (IFN-, IL-2 e IL-12p70), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) y citocinas expresadas por ambos subconjuntos (GM-CSF) para evaluar su posible relación con la gravedad de la EA. Los niveles séricos de citocinas como IL-10, TNF-, IL-12p70 y GM-CSF de ratones a los que se administró HW se redujeron significativamente en comparación con el grupo PW. Los resultados sugieren que HW afecta la dermatitis alérgica de contacto a través de la modulación de las respuestas Th1 y Th2 en ratones NC/Nga. Esta es la primera nota sobre el efecto de beber HW en la EA, lo que implica clínicamente un remedio potencial prometedor para el tratamiento de la EA.

1. Introducción

La dermatitis atópica (DA) es un trastorno alérgico inflamatorio de la piel caracterizado por respuestas inmunológicas alteradas [1]. La DA suele afectar a entre el 10 % y el 20 % de los lactantes y niños pequeños, pero puede persistir hasta la edad adulta (1-3 %), ya que suele ser una enfermedad de la piel de larga duración [2]. La EA tiene una etiología compleja que implica la interrelación de varios factores, como la disfunción genética, ambiental, farmacológica, psicológica, inmunológica y de la barrera cutánea [3]. La función inmunitaria alterada recibió especial atención como el principal factor que contribuye al inicio, desarrollo y gravedad de la EA. La DA está bien caracterizada por tener un fenotipo clínico como niveles elevados de IgE en suero, eosinofilia periférica y eczematosa.

lesiones cutáneas infiltradas por células inflamatorias [4, 5]. Los ratones NC/Nga fueron el primer modelo animal representativo para investigar y desarrollar un tratamiento para enfermedades cutáneas similares a la EA [6, 7]. En entornos convencionales, se observó que los ratones NC/Nga desarrollaron espontáneamente lesiones en la piel caracterizadas por un comportamiento de rascado, eritema y hemorragia, edema, descamación y sequedad de la piel comparables con la EA humana. En un entorno libre de patógenos, el modelo de ratón NC/Nga no muestra lesiones en la piel y, por lo tanto, los síntomas similares a los de la EA se desencadenan por la exposición a un estímulo. *Dermatophagoides farinae* (Df) es una especie cosmopolita de ácaros del polvo doméstico y una causa común que contribuye a la DA. La aplicación tópica de este extracto de alérgeno Df (DfE) produce dermatitis atópica como lesiones cutáneas en ratones NC/Nga [8, 9]. Por lo tanto, adopción

Modelo de ratón NC/Nga expuesto con DfE que imita la patogénesis de la EA humana.

Se ha demostrado que la molécula de hidrógeno tiene excelentes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. El hidrógeno activo actúa como antioxidante y mostró protección contra el daño inducido por oxidación *in vitro* [10]. También se ha informado que puede eliminar selectivamente especies reactivas de oxígeno (ROS) [11] y mostró una influencia positiva en el desequilibrio de citocinas [12]. Se sabe que el hidrógeno penetra fácilmente en la piel, se difunde rápidamente en los tejidos y las células y se distribuye en el cuerpo a través del flujo sanguíneo [13]. El H₂ se puede incorporar al cuerpo mediante la inhalación de gas H₂, beber agua con H₂ disuelto e inyectar solución salina con H₂ disuelto. El HW producido por electrólisis del agua se incluye en el agua potable que contiene una alta concentración de hidrógeno gaseoso y tiene propiedades de alto hidrógeno disuelto (DH), nivel de potencial de oxidación-reducción (ORP) negativo y pH neutro.

Estudios previos sobre agua electrolizada reducida (ERW) y agua alcalina reducida, que también son agua rica en hidrógeno producida por la misma reacción con HW, mostraron varios efectos beneficiosos, como la reducción de los niveles de triglicéridos séricos y glucosa en sangre en el modelo de rata diabética OLETF [14, 15], la prevención de la resistencia a la insulina [16] y la inflamación del hígado [17]. Además, la ingesta oral de agua rica en hidrógeno mostró un efecto antialérgico *in vivo* [18]. Sin embargo, en la actualidad, no hay evidencia de que beber agua rica en DH proporcione beneficios para los pacientes con EA. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue examinar el efecto de beber agua hidrogenada (HW) con DH alta, ORP bajo y pH neutro sobre la DA inducida por la aplicación repetida de pomada DfE en ratones NC/Nga. Podríamos esperar que beber HW complemente los medicamentos tópicos para la EA a través de la modulación de las respuestas Th1 y Th2.

2. Materiales y métodos

2.1. Preparación de Agua de Control (Agua Purificada). El agua purificada (PW) se preparó utilizando agua del grifo (TW) como fuente de agua. El TW se purificó mediante un proceso de ósmosis inversa (RO) (filtro de membrana R/O, Coway Co. Ltd., Gumi, República de Corea). En el proceso de RO, el TW es empujado contra una membrana semipermeable especial por la presión en la línea de flotación que causa la compresión molecular separando así las moléculas de agua de los contaminantes. Las moléculas de agua luego pasan al interior de la membrana. El Filtro de Membrana OI rechaza los contaminantes en función de su tamaño y está equipado con un poro de ultrafiltración que tiene un tamaño de alrededor de 0,001 m. El PW generado se usó como agua de control administrada al grupo de control positivo (PC) y tenía un valor de ORP de 292 ± 5 mV, DH de $0,002 \pm 0,001$ ppm y un pH de $7,01 \pm 0,02$.

2.2. Preparación de Agua de Prueba (Agua de Hidrógeno). El HW se preparó usando PW generado a través de RO y ultrafiltración. El PW se procesó adicionalmente mediante un aparato de electrólisis de agua (Samsung Highly Reactive Hydrogen Reduced Water Maker, Samsung Electronics Co., Ltd., Corea) y se recogió del tanque de agua que contenía una placa de platino de cátodo. El valor de ORP se controló a -510 ± 6 mV (HM-21P, TOA Electronics Co., Japón) y el valor de DH se controló

a $0,50 \pm 0,02$ ppm (DH-35A, DKK-TOA Co., Japón) mediante electrólisis del agua. El pH de HW se reguló a $7,30 \pm 0,02$ mediante la neutralización de OH⁻ generado durante la electrólisis en el tanque de agua del cátodo. El HW generado se utilizó como agua de prueba suministrada al grupo HW.

2.3. animales Se compraron ratones NC/Nga machos de cuatro semanas de edad que pesaban 25 ± 2 g de Orient Bio Inc. (Corea) y se mantuvieron durante 1 semana antes de los experimentos. Los ratones se alojaron en jaulas de acero inoxidable en un ambiente controlado con temperatura de 22 ± 2 °C y 40–60% de humedad bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas. El Protocolo de Uso y Cuidado de Animales para este Experimento con Animales fue aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC) en el Campus de Wonju, Universidad de Yonsei, Gangwon, Wonju, República de Corea.

2.4. Inducción de dermatitis atópica en ratones NC/Nga. AD como lesiones cutáneas en ratones NC/Nga se realizaron utilizando antígeno de ácaros como se describe anteriormente [19]. Se afeitó el pelo de la espalda con crema depilatoria (Veet, Oxy Reckitt Benckiser Ltd., Francia) 1 día antes de los experimentos. La región dorsal expuesta se trató con 200 L de ungüento DfE (Biostir AD, Biostir, Kobe, Japón) preparado a partir de ácaros del polvo doméstico, un alérgeno de extracto crudo de *Dermatophagoides farinae* como se describió anteriormente [9], dos veces por semana durante 3 semanas. Los ratones NC/Nga se asignaron aleatoriamente a dos grupos: PW (= 12) y HW (= 12). Los ratones recibieron el último tratamiento de agua (administración de agua) el día 25 y se sacrificaron el día 26 para evaluar los cambios inmunológicos.

2.5. Análisis de Th1, Th2 y Citoquinas Proinflamatorias. Se investigaron las citoquinas secretadas en la sangre. Las concentraciones séricas de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, TNF- α e IFN- γ se midieron con el kit Multiplex (Bio Rad, San Diego, EE. UU.) y se ejecutaron con tecnología Luminex (Bio-Plex Multiplex Bead Array System, Bio-Rad Hercules, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. El software analizó los datos de fluorescencia sin procesar mediante un método logístico de 5 parámetros.

2.6. Análisis estadístico. Los valores de los datos se expresaron como la media \pm SEM. Los valores medios entre los grupos se analizaron y compararon mediante un análisis de varianza unidireccional seguido de una prueba de comparación múltiple posterior (Tukey) con los paquetes de software Graph Prism versión 5.0 (GraphPad Software, EE. UU.). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas en $<0,05$, $<0,01$ y $<0,001$.

3. Resultados y discusión

En la actualidad, no hay evidencia del efecto de la bebida de HW sobre la EA. Aquí, investigamos la relación entre beber HW y AD a través del examen de varias citocinas estrechamente relacionadas con AD y examinamos la posibilidad terapéutica de HW. La aplicación repetida de DfE a ratones NC/Nga conduce a lesiones cutáneas similares a la dermatitis atópica caracterizadas por una respuesta inmunitaria alterada. Estudios previos han señalado la importancia de las citocinas Th1 y Th2, que son

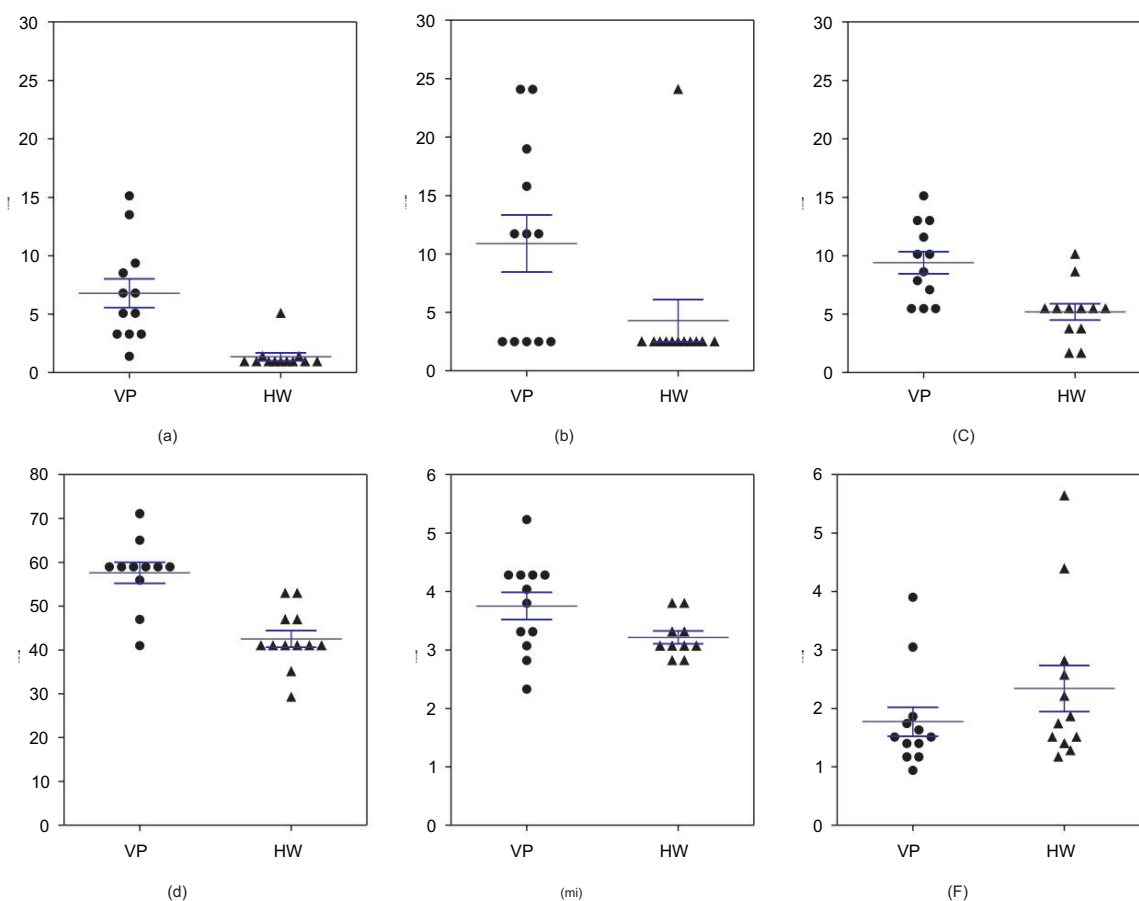


Figura 1: Efecto de beber agua con hidrógeno (HW) sobre las citocinas proinflamatorias, auxiliares T (Th) 1 y Th2. Los ratones a los que se les administró HW redujeron significativamente los niveles de extracto de *Dermatophagoides farinae* que tenían (DfE-) citoquinas inducidas IL-10 (a), GM-CSF (b), IL-12p70 (c) y TNF- (d). IL-2 (e) e IL-4 (f) no difirieron significativamente entre los grupos HW y agua purificada (PW). Los datos son la media \pm DE, $n = 12$. $< 0,05$, $< 0,001$ indican diferencias significativas probadas con ANOVA. Para las pruebas post hoc se utilizó la prueba de Tukey.

se encontró que se sobreexpresaba en la piel como medio de respuesta inflamatoria en modelos experimentales de inflamación alérgica inducida por alérgenos en ratones [5]. Además, después de la aplicación de DfE, Th1, Th2 y las citoquinas proinflamatorias aumentaron en concentración, como lo demostró el estudio de Sung y colegas [20]. Aquí, investigamos el efecto de beber HW en las citocinas séricas (Th1, Th2 y proinflamatorias) utilizando el sistema de matriz de perlas Luminex conocido por su alta sensibilidad y precisión. La suplementación de HW disminuyó significativamente los niveles de citocinas IL-10 inducidas por DfE (Figura 1 (a)), GM-CSF (Figura 1 (b)), IL-12p70 (Figura 1 (c)) y TNF- (Figura 1 (d)). La IL-10 producida principalmente por las células Treg participa en la desregulación inmunitaria que es característica de la EA humana y se sugiere que la IL-10 inhibe la inmunidad mediada por células, lo que puede explicar la reducción de la reactividad alérgica por contacto en los casos de EA [21]. Se ha considerado que la IL-10, que es una de las citoquinas tradicionales implicadas en la EA, tiene un papel conflictivo. La producción de IL-10 por los linfocitos T CD4+ varía según la gravedad de la EA, siendo menor en la EA grave que en la EA leve [22]. Una comprensión profunda del efecto de la IL-10 ayudará en la interpretación de la patogenia de la EA. Como lo señaló

Niwa [23]; los niveles plasmáticos de IL-10 parecen correlacionarse inversamente con la gravedad de la EA. Sin embargo, otros estudios han demostrado una mayor producción de IL-10 [21, 24]. Las células T estimuladas con IL-12 mostraron inducción de IL-10 in vitro [25]. El nivel más bajo de IL-10 en nuestro estudio podría estar relacionado con el nivel reducido de IL-12p70. La IL-12, que consiste en las subunidades p35 y p40, aumenta la producción de citoquinas Th1 [26]. Estos resultados sugieren que HW suprime el desarrollo de AD al suprimir el nivel de citoquinas. Por el contrario, los niveles de IL-2 (Figura 1(e)) e IL-4 (Figura 1(f)) no difirieron significativamente entre los grupos HW y PW (control). Además, IL-5 e IFN- fueron indetectables en el suero de ratones NC/Nga (datos no mostrados). Estos resultados podrían explicarse, en parte, por la variabilidad en el origen de las muestras (sangre o piel), el momento en que se recolectó la muestra y también por los diferentes métodos de ensayo empleados.

La aplicación repetida del alérgeno indujo una mayor producción de citocinas Th2 [27]. La suplementación de HW suprimió esta producción de citoquinas. Las propiedades químicas de HW que usamos en este estudio son DH alto, ORP bajo y pH neutro. El efecto anulador de HW en Th1, Th2 y citocinas proinflamatorias en el modelo de AD es

atribuible al rico contenido de hidrógeno de HW. Como se discutió por Xie et al. [28], el gas hidrógeno tiene propiedades antiinflamatorias en el modelo de inflamación generalizada inducida por zymosan, en parte al reducir los niveles de citocinas proinflamatorias en el suero. En nuestros estudios previos relacionados con el efecto inmunológico de los ERW ricos en hidrógeno, se descubrió que bañarse restaura el desequilibrio de citocinas en modelos de ratones con lesiones cutáneas inducidas por UVB [12] y beber ERW mejoró la obesidad mediante la restauración de la red de adipocinas y citocinas inflamatorias [29]. Teniendo en cuenta estos datos informados, el efecto beneficioso de DH en HW podría deberse, en parte, a la propiedad antiinflamatoria del hidrógeno [30], como la regulación a la baja de Th1, Th2 y citocinas proinflamatorias.

El hidrógeno representa un gas medicinal emergente seguro y potente que promete proporcionar un tratamiento y control preventivo de varias enfermedades. El hidrógeno se puede administrar al cuerpo bebiendo agua rica en H₂ como HW, inhalando gas H₂, inyectando solución salina con H₂ disuelto y tomando un baño de hidrógeno. Entre estos métodos aceptados de administración de hidrógeno en el cuerpo, la bebida o la ingesta oral de agua rica en hidrógeno es la más conveniente y adecuada para el consumo continuo para uso terapéutico.

No solo el hidrógeno tiene efectos antiinflamatorios, sino que varios estudios han demostrado que el hidrógeno exhibe efectos de estrés antioxidante [11, 13, 30, 31]. Es de destacar que el H₂ tiene varias ventajas como antioxidante potencial, ya que es lo suficientemente suave como para no alterar ninguna reacción metabólica de oxidación-reducción, evitando así que las células de mamíferos inicien el mecanismo de defensa que conduce a la producción de ROS [11]. Nuestro HW podría ser un candidato factible como antioxidante no solo porque tiene un DH alto, sino que también tiene un ORP bajo (negativo). "Como se discutió en otra parte [32]"; un ORP reducido significa una mayor capacidad reductora. En la industria de los ionizadores de agua, el ORP es equivalente al potencial antioxidante, y el negativo implica el poder reductor del agua. Este estudio es el primero en proporcionar evidencia del efecto de beber HW sobre la EA. Para descubrir el mecanismo profundo de HW en la respuesta inflamatoria, serían necesarios más estudios dirigidos a las vías de señalización y la producción de ROS, ya que la DA es un tipo de enfermedad inflamatoria y relacionada con el estrés oxidativo. Este estudio abre una nueva mirada al nuevo tratamiento terapéutico y preventivo de la DA, aplicando fluidos más seguros como el HW. Además, nuestros resultados prestan atención y mejoran la comprensión de aquellas citoquinas tradicionales que posiblemente podrían afectar la gravedad de la EA. Juntos, estos datos, aunque contradictorios, sugieren que el papel de las citocinas tradicionales implicadas en la EA debe examinarse escrupulosamente y que aún se esperan más estudios sobre cómo funciona HW a nivel molecular a la espera de una respuesta. Por último, el potencial de HW como antioxidante está en marcha.

4. Conclusiones

Para concluir, beber HW suprimió los niveles de mediadores relacionados con la inflamación, como Th1, Th2 y citocinas proinflamatorias, que son los principales actores en la patogenia de la EA humana. Además, este estudio proporciona una nueva perspectiva de la relevancia de ciertas citocinas en la EA. HW representa un tratamiento terapéutico y preventivo potencialmente alternativo de la EA.

abreviaturas

H₂: Hidrógeno molecular
 AD: Dermatitis atópica HW:
 Agua de hidrógeno Df:
 Dermatophagoides farinae DfE: Extracto de Df ORP: Potencial de reducción de oxidación DH: Hidrógeno disuelto PW: Agua purificada TW: Agua del grifo RO: Ósmosis inversa IACUC: Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales ERW: Agua reducida electrolizada ROS: Especies reactivas de oxígeno.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Reconocimiento

Esta investigación fue apoyada por una subvención (YUWCM-2011-17) de la Facultad de Medicina de Wonju, Universidad de Yonsei, República de Corea.

Referencias

- [1] M. Auriemma, G. Vianale, P. Amerio y M. Reale, "Cytokines and T cells in atopic dermatitis", *European Cytokine Network*, vol. 24, núm. 1, págs. 37 a 44, 2013.
- [2] L. Schneider, S. Tilles, P. Lio et al., "Dermatitis atópica: una actualización de parámetros de práctica 2012", *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 131, núm. 2, págs. 295–299, 2013.
- [3] M. Udompataikul y D. Limpa-o-vart, "Estudio comparativo de dexpantenol al 5 % en una formulación de agua en aceite con ungüento de hidrocortisona al 1 % en el tratamiento de la dermatitis atópica infantil: un estudio piloto", *Journal of Drugs in Dermatology*, vol. 11, núm. 3, págs. 366–374, 2012.
- [4] DYM Leung y T. Bieber, "Dermatitis atópica", *The Lancet*, vol. 361, núm. 9352, págs. 151 a 160, 2003.
- [5] DYM Leung, M. Boguniewicz, MD Howell, I. Nomura y QA Hamid, "Nuevos conocimientos sobre la dermatitis atópica", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 113, núm. 5, págs. 651–657, 2004.
- [6] H. Matsuda, N. Watanabe, GP Geba et al., "Desarrollo de una lesión cutánea similar a la dermatitis atópica con hiperproducción de IgE en ratones NC/Nga", *International Immunology*, vol. 9, núm. 3, págs. 461–466, 1997.
- [7] YY Sung, YS Kim y HK Kim, "El extracto de *Illicium verum* inhibe la expresión inducida por TNF e IFN de quimiocinas y citocinas en queratinocitos humanos", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 144, núm. 1, págs. 182 a 189, 2012.
- [8] H. Matsuoka, N. Maki, S. Yoshida et al., "Un modelo de ratón del síndrome de eccema/dermatitis atópica mediante la aplicación repetida de un extracto crudo del ácaro del polvo doméstico *Dermatophagoides farinae*" *Allegria*, vol. 58, núm. 2, págs. 139–145, 2003.
- [9] M. Yamamoto, T. Haruna, K. Yasui et al., "Un nuevo modelo de dermatitis atópica inducido por la aplicación tópica con extracto de *Dermatophagoides farinae* en ratones NC/Nga", *Allergology International*, vol. 56, núm. 2, págs. 139–148, 2007.

- [10] S. Shirahata, Y. Li, T. Hamasaki et al., "Regulación redox por aguas reducidas como donantes de hidrógeno activo y eliminadores de ROS intracelulares para la prevención de la diabetes tipo 2", en *Cell Technology For Cell Products*, E. Smith, Ed., vol. 3, págs. 99–101, 2007.
- [11] I. Ohsawa, M. Ishikawa, K. Takahashi et al., "El hidrógeno actúa como un antioxidante terapéutico al reducir selectivamente los radicales de oxígeno citotóxicos", *Nature Medicine*, vol. 13, núm. 6, págs. 688–694, 2007.
- [12] KS Yoon, XZ Huang, YS Yoon et al., "Estudio histológico sobre el efecto del baño de agua reducido electrolizado en lesiones cutáneas inducidas por radiación UVB en ratones sin pelo", *Boletín biológico y farmacéutico*, vol. 34, núm. 11, págs. 1671–1677, 2011.
- [13] S. Ohta, "Progreso reciente hacia la medicina del hidrógeno: potencial del hidrógeno molecular para aplicaciones preventivas y terapéuticas", *Current Pharmaceutical Design*, vol. 17, núm. 22, págs. 2241 a 2252, 2011.
- [14] D. Jin, SH Ryu, HW Kim et al., "Efectos antidiabéticos del agua reducida electrolizada en ratas OLEFT", *Bioscience, Biotech nology, and Biochemistry*, vol. 70, núm. 1, págs. 31 a 37, 2006.
- [15] M.-J. Kim y HK Kim, "Efectos antidiabéticos del agua reducida electrolizada en ratones diabéticos genéticos e inducidos por estreptozotocina", *Life Sciences*, vol. 79, núm. 24, págs. 2288–2292, 2006.
- [16] S. Kajiyama, G. Hasegawa, M. Asano 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". *Investigación en nutrición*, vol. 28, núm. 3, págs. 137–143, 2008.
- [17] B. Gharib, S. Hanna, OMS Abdallahi, H. Lepidi, B. Gardette y M. De Reggi, "Propiedades antiinflamatorias del hidrógeno molecular: investigación sobre la inflamación del hígado inducida por parásitos", *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences III*, vol. 324, núm. 8, págs. 719–724, 2001.
- [18] T. Itoh, Y. Fujita, M. Ito et al., "El hidrógeno molecular suprime la transducción de señales mediada por Fc RI y previene la desgranulación de los mastocitos", *Comunicaciones de investigación bioquímica y biofísica*, vol. 389, núm. 4, págs. 651–656, 2009.
- [19] Y.-Y. Sung, T. Yoon, JY Jang, S.-J. Park, G.-H. Jung y H. K. Kim, "Efectos inhibidores del extracto de *Cinnamomum cassia* en las lesiones cutáneas similares a la dermatitis atópica inducidas por el antígeno del ácaro en ratones NC/Nga", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, núm. 2, págs. 621–628, 2011.
- [20] YY Sung, WK Yang, AY Lee et al., "La aplicación tópica de un extracto de etanol preparado a partir de *Illicium verum* suprime la dermatitis atópica en ratones NC/Nga", *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 144, núm. 1, págs. 151 a 159, 2012.
- [21] JD Ohmen, JM Hanifin, BJ Nickoloff et al., "Sobreexpresión de IL-10 en dermatitis atópica: contraste de patrones de citoquinas con reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado", *The Journal of Immunology*, vol. 154, núm. 4, págs. 1956–1963, 1995.
- [22] SL Seneviratne, L. Jones, AS Bailey, AP Black y GS Ogg, "La dermatitis atópica grave se asocia con una frecuencia reducida de células T CD4+ productoras de alérgeno específicas de IL-10", *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 31, núm. 5, págs. 689–694, 2006.
- [23] Y. Niwa, "Niveles elevados de RANTES en plasma o piel y niveles reducidos de IL-10 en plasma con subconjuntos de pacientes con dermatitis atópica grave", *Archives of Dermatology*. vol. 136, núm. 1, págs. 125 y 126, 2000.
- [24] D. Simon, LR Braathen y H.-U. Simon, "Aumento del factor de necrosis tumoral inducido por lipopolisacáridos- interferón- γ y la producción de interleucina-10 en la dermatitis atópica", *British Revista de Dermatología*, vol. 157, núm. 3, págs. 583–586, 2007.
- [25] Y. Yoshizawa, H. Nomaguchi, S. Izaki y K. Kitamura, "Niveles séricos de citocinas en la dermatitis atópica", *Dermatología clínica y experimental*, vol. 27, núm. 3, págs. 225–229, 2002.
- [26] H. Tanaka, M. Narita, S. Teramoto et al., "Papel de la interleucina-18 y las citoquinas T-helper tipo 1 en el desarrollo de la neumonía por *Mycoplasma pneumoniae* en adultos", *Chest*, vol. 121, núm. 5, págs. 1493–1497, 2002.
- [27] EB Brandt y U. Sivaprasad, "Citocinas Th2 y dermatitis atópica", *Revista de inmunología clínica y celular*, vol. 2, núm. 3, págs. 1 a 25, 2011.
- [28] K. Xie, Y. Yu, Z. Zhang et al., "El gas de hidrógeno mejora la tasa de supervivencia y el daño de órganos en el modelo de inflamación generalizada inducida por zymosan", *Shock*, vol. 34, núm. 5, págs. 495–501, 2010.
- [29] RC Ignacio, TY Kang, CS Kim et al., "Anti-obesidad de agua alcalina reducida en ratones obesos alimentados con alto contenido de grasa", *Boletín biológico y farmacéutico*, vol. 36, núm. 7, págs. 1052–1059, 2013.
- [30] C.-S. Huang, T. Kawamura, Y. Toyoda y A. Nakao, "Recientes avances en la investigación del hidrógeno como gas médico terapéutico" *Investigación de radicales libres*, vol. 44, núm. 9, págs. 971–982, 2010.
- [31] S. Ohta, "El hidrógeno molecular es un antioxidante novedoso para reducir eficientemente el estrés oxidativo con potencial para mejorar las enfermedades mitocondriales", *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1820, núm. 5, págs. 586–594, 2012.
- [32] KC Nam y DU Ahn, "Efectos del ácido ascórbico y los antioxidantes en el color de la carne molida irradiada", *Journal of Food Science*, vol. 68, núm. 5, págs. 1686–1690, 2003.