

## Artículo de investigación

# La ingesta de agua rica en hidrógeno acelera el paladar oral Cicatrización de heridas a través de la activación del Nrf2/antioxidante Vías de defensa en un modelo de rata

Naofumi Tamaki, Rita Cristina Orihuela-Campos, Makoto Fukui e Hiro-O Ito

Departamento de Odontología Preventiva, Instituto de Ciencias Biomédicas, Escuela de Graduados de la Universidad de Tokushima,  
3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8504, Japón

La correspondencia debe dirigirse a Naofumi Tamaki; [tamanaof@tokushima-u.ac.jp](mailto:tamanaof@tokushima-u.ac.jp)

Recibido el 20 de agosto de 2015; Aceptado el 11 de octubre de 2015

Editor Académico: Javier Egea

Derechos de autor © 2016 Naofumi Tamaki 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 proceso de cicatrización de heridas intenta restaurar la integridad y función del tejido lesionado. Además, las citoquinas proinflamatorias, los factores de crecimiento y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la cicatrización de heridas. El objetivo de este estudio fue determinar si la ingesta de agua rica en hidrógeno induce la activación de la vía de defensa Nrf2/antioxidante en el tejido palatino de rata, reduciendo así el estrés oxidativo sistémico y los niveles de citoquinas proinflamatorias y promoviendo los genes asociados a la curación. Se creó una herida de escisión circular en la región palatal oral y se observó el proceso de cicatrización de la herida. Las ratas se dividieron en dos grupos experimentales en los que se consumió agua rica en hidrógeno o agua destilada. En el agua potable rica en hidrógeno, el proceso de cicatrización de la herida del paladar se aceleró en comparación con el del grupo de control. A medida que el hidrógeno molecular aumentaba la vía Nrf2, el estrés oxidativo sistémico se reducía por la activación de la actividad antioxidante. Además, la ingesta de agua rica en hidrógeno redujo los niveles de citoquinas proinflamatorias y promovió la expresión de factores asociados con la curación en el tejido palatino de rata.

En conclusión, la ingesta de agua rica en hidrógeno exhibió múltiples efectos beneficiosos a través de la activación de la vía de defensa antioxidante/Nrf2. Los resultados de este estudio respaldan la hipótesis de que la administración oral de agua rica en hidrógeno beneficia el proceso de cicatrización de heridas al disminuir el estrés oxidativo y las respuestas inflamatorias.

## 1. Introducción

El proceso de cicatrización de heridas después de una lesión relacionada con un traumatismo está implicado en la restauración de la integridad y la función del tejido lesionado. Este proceso inicia una secuencia ordenada pero compleja de eventos que establecen la integridad de los tejidos dañados. Se considera que ha tenido lugar la regeneración cuando el tejido se repara estructural y funcionalmente a su estado original como resultado del proceso de curación. En general, la cicatrización de heridas ocurre en una cascada de fases superpuestas, comenzando con la fase inflamatoria precipitada por la lesión y seguida secuencialmente por las fases de proliferación y remodelación tisular [1]. Múltiples citocinas proinflamatorias, quimiocinas y factores de crecimiento contribuyen al éxito de la reparación de heridas.

Además, también es importante centrarse en las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el contexto de la cicatrización de heridas [2].

El estrés oxidativo se ha informado en muchas enfermedades en las que la producción de ROS y la modificación oxidativa de varias biomoléculas son la base de su fisiopatología, especialmente los procesos asociados con la inflamación. Existe evidencia de que el estrés oxidativo es un factor clave que contribuye a las condiciones inflamatorias como la estomatitis aftosa recurrente, que causa una herida en la mucosa oral sin una causa subyacente bien establecida [3]. Durante la inflamación inducida por heridas, las células del sistema inmunitario liberan ROS y citoquinas inflamatorias para matar los microorganismos. Sin embargo, también se sabe que estas moléculas son un factor importante en la etiología del daño tisular local [4]. La producción de ROS en el proceso inflamatorio conduce a una marcada inflamación durante la cual se observa la secreción de varios quimioatrayentes.

La estimulación quimiotáctica de la fagocitosis induce la activación de un sistema enzimático unido a la membrana que transfiere

electrones de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato citosólico (NADP<sup>+</sup>) al oxígeno extracelular, lo que da como resultado la producción del radical superóxido, un ROS bien establecido [5].

Los efectos biológicos beneficiosos del hidrógeno molecular en muchas enfermedades y estados fisiológicos están ampliamente respaldados en la literatura científica relevante [6]. El hidrógeno molecular tiene potencial como un nuevo antioxidante en aplicaciones preventivas y terapéuticas, además de sus efectos antiinflamatorios [7]. También se ha informado que el hidrógeno molecular activa el factor 2 relacionado con el factor E2 nuclear (Nrf2)/vía de defensa antioxidante [8]. La translocación de Nrf2 al núcleo conduce a una regulación positiva de la expresión de genes que codifican enzimas de fase 2 involucradas en los sistemas de defensa contra el estrés oxidativo y otras fuentes tóxicas [9]. Nrf2 coopera con el sistema de defensa antioxidante para regular genes como la hemoxygenasa 1 (HO-1) y la NAD(P)H quinina oxidoreductasa 1 (NQO-1).

Se ha informado que la inhalación de gas que contiene hidrógeno estimula la cicatrización de heridas cutáneas inducidas por radiación [10]. Sin embargo, no está claro si los beneficios de la ingesta de agua rica en hidrógeno sobre el estrés oxidativo y la inflamación están involucrados en la cicatrización de las heridas palatinas orales. El objetivo de este estudio fue determinar si el agua rica en hidrógeno induce la activación de la vía de defensa Nrf2/antioxidante en el tejido palatino, reduciendo así el estrés oxidativo y los niveles de citoquinas proinflamatorias. En un modelo de rata, examinamos si estos efectos podrían promover el proceso de cicatrización de heridas. Se controló el cierre de la herida y se determinó la expresión génica en tejido palatino de rata después de la lesión para citoquinas proinflamatorias (interleucina 1 beta [IL-1], interleucina 6 [IL-6] y factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ]); quimiocinas (proteína quimiotáctica de monocitos-1 [MCP-1] y proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa [MIP-1]); factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante beta 1 [TGF-1], factor de crecimiento de fibroblastos 7 [FGF7] y factor de crecimiento del endotelio vascular [VEGF]); y factores asociados a la cicatrización (actina de músculo liso alfa [ $\alpha$ -SMA] y colágeno tipo 1 [Col 1]). Todos estos genes son importantes para el proceso de cicatrización de heridas y muestran altos niveles de expresión al principio de la fase de remodelación.

## 2. Material y Métodos

**2.1. animales** Veinticuatro ratas Wistar macho (8 semanas de edad) que pesaban 320–340 g se alojaron en jaulas de alambre individuales en una habitación con temperatura y humedad controladas (23  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C y 60%  $\pm$  5% de humedad relativa) con un ciclo de luz y oscuridad de 12 h. Los animales recibieron gránulos estándar para ratas y agua potable. Todos los animales recibieron cuidados humanos de acuerdo con las pautas institucionales de cuidado de animales, y el Comité de Control de Investigación Animal de la Escuela de Graduados de la Universidad de Tokushima (protocolo número 12098) aprobó el protocolo experimental.

**2.2. Herida y preparación del tejido de la herida.** Antes de la herida, todas las ratas fueron anestesiadas con una inyección de pentobarbital sódico con solución salina fisiológica, después de lo cual se realizó una herida por escisión circular de espesor completo, de 3,5 mm de diámetro,

se creó utilizando un sacabocados de biopsia estéril (Kai Medical, Seki City, Japón) en el centro de la región oral palatina de cada animal (Figura 1(a)) [11]. Los animales fueron observados y pesados los días 0, 1, 2, 3 y 7. Para fines de observación, las ratas fueron anestesiadas usando un anestésico inhalatorio con isoflurano; Se tomaron fotografías clínicas de las heridas palatinas con una cámara digital los días 0, 1, 2, 3 y 7. En cada fotografía, se incluyó una regla de acero inoxidable para calibrar la medición del área de la herida entre imágenes [2]. Se utilizó un programa informático gratuito (Imagen J; NIH, Bethesda, MD, EE. UU.) para medir el área de la herida. El cierre de la herida del paladar de cada punto de tiempo se calculó mediante la siguiente fórmula: porcentaje de cierre de la herida (%) = (WA0 - WA)/WA0  $\times$  100, donde WA corresponde al área de la herida, 0 significa el día 0 (línea de base) y representa cada punto de tiempo después del tratamiento.

Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos experimentales de doce cada uno: (1) grupo de control tratado con agua destilada y (2) grupo de agua hidrogenada (HW) tratado con agua rica en hidrógeno. Cada tipo de agua se colocó dos veces al día en un recipiente de vidrio cerrado equipado con una línea de salida que contenía dos cojinetes de bolas, lo que evitaba que el agua se desgasificara. La capacidad de conservación de hidrógeno molecular de este método se ha establecido previamente [12]. Las ratas consumieron agua destilada o agua rica en hidrógeno hasta 3 o 7 días después del tratamiento.

Se sacrificaron seis ratas de cada grupo bajo anestesia general y se recogieron muestras de sangre cardíaca del corazón en cada momento experimental: 3 o 7 días después del tratamiento. El suero se separó por centrifugación a 3000  $\times$ g durante 20 min y se almacenó a -80  $^{\circ}$ C hasta su uso. Se cosechó toda el área de la herida utilizando un punzón de biopsia estéril de seis ratas por grupo el día 3 o el día 7. El tejido palatino extirpado se subdividió inmediatamente y se procesó para su uso en cada experimento [13].

**2.3. Preparación de agua rica en hidrógeno.** El agua rica en hidrógeno se preparó utilizando un kit Aquela (Ecomo International Co., Ltd., Fukuoka, Japón). El gas hidrógeno se obtuvo en un tubo de resina acrílica usando material para producir hidrógeno molecular en una botella de tereftalato de polietileno (PET) para proporcionar una bebida carbonatada que contenía 500 mL de agua [14].

La concentración de hidrógeno molecular en el agua se midió de acuerdo con un método previamente informado [15]. Confirmamos que la concentración de hidrógeno molecular era de 5 a 7 ppm en agua rica en hidrógeno antes de su uso. En un recipiente de vidrio, la concentración de hidrógeno fue superior a 1 ppm después de 24 h.

**2.4. PCR en tiempo real.** Las muestras palatinas divididas se colocaron inmediatamente en 1 mL de RNAlater (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) y se congelaron. El ARN total de una muestra de tejido palatino se aisló usando TRIzol (Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de ARN se determinó a partir de la densidad óptica a una longitud de onda de 260 nm usando una unidad OD260 equivalente a 40 g/mL de ARN. La pureza del RNA aislado se determinó mediante la relación de absorbancia de 260/280 nm, y solo se utilizaron muestras con una relación superior a 1,8. Un microgramo de ARN total aislado se transcribió inversamente a

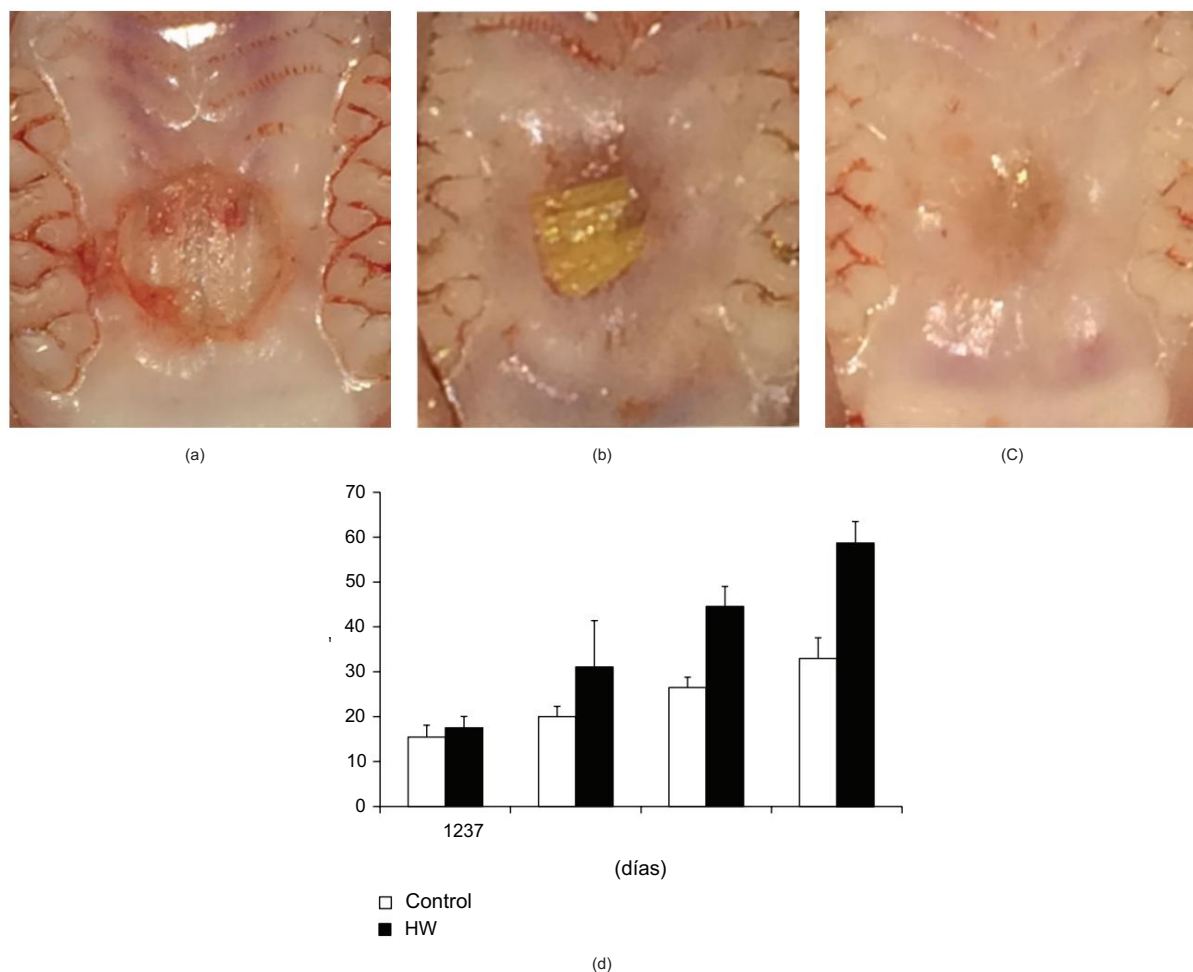


Figura 1: Fotografías y porcentaje de cicatrización de las heridas palatinas en ratas bebiendo agua destilada o rica en hidrógeno. (a) Se creó una herida de escisión circular (3,5 mm de diámetro) de espesor total con un punzón quirúrgico al inicio del estudio. Se muestran las fotografías de las heridas palatinas del grupo (b) de control y (c) del grupo HW a los 7 días después del tratamiento. (d) Se calcularon y trazaron los cambios en el cierre de la herida del paladar para cada grupo a lo largo de este estudio. Las comparaciones se representan dentro de cada punto de tiempo. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ).

< 0,01: significativamente diferente del grupo de control.

ADNc utilizando ReverTra Ace (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japón).

La Tabla 1 muestra las secuencias de los cebadores de los genes de interés en este estudio. La cuantificación se realizó mediante un sistema de PCR en tiempo real (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) con SYBR Green (Bio-Rad) [16]. Los parámetros del ciclo fueron los siguientes:

desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 20 s, recocido a 60 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Los niveles de ARNm se calcularon determinando el número relativo de copias de cada ARNm con respecto al gen de control interno (GAPDH) para cada muestra, y del grupo de control a los 3 días después del tratamiento se normalizó a 1.

**2.5. Análisis de Western Blot.** El tejido palatino de rata dividido se recogió en tampón de lisis, al que se añadió un cóctel de inhibidores de proteasa y se homogeneizó completamente. El contenido de proteínas se determinó con el reactivo de Bradford utilizando albúmina de suero bovino como estándar. Se separó una cantidad igual de proteína del tejido palatino con dodecilsulfato de sodio.

electroforesis en gel de poliacrilamida durante 30 min a 200 V y se transfirió a membranas de difluoruro de polivinilideno durante 60 min a 100 V. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada en polvo al 5 % en solución salina tamponada con Tris con Tween-20 durante 1 h. Posteriormente, las membranas se probaron con anticuerpo primario (iNOS [dilución 1: 200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.]) y actina (dilución 1: 1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU.) durante la noche a 4 °C, seguido de incubación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante anti-ratón (dilución 1: 3000; Cell Signaling Technology) durante 1 h. La detección se realizó usando quimioluminiscencia mejorada. Las inmunotransferencias se escanearon mediante densitometría y la intensidad se cuantificó utilizando el software Image J (NIH).

**2.6. Niveles séricos de biomarcadores de especies reactivas de nitrógeno.** Los niveles de metabolitos de óxido nítrico (NO) (NOx; nitrito + nitrato) se determinaron con un kit de ensayo colorimétrico de nitrato/nitrito utilizando la reacción de Griess (Dojindo, Tokio, Japón), según

Tabla 1: Cebadores utilizados en la PCR en tiempo real.

Gene	Orientación	Secuencia de cebadores
Nrf2	Adelante	5 -GCTATTTTCCATTCCCGAGTTAC-3
	Contrarrestar	5 -ATTGCTGTCCATCTCTGTCAG-3
HO-1	Adelante	5 -CTTTCAGAAGGGTCAGGTGTC-3
	Contrarrestar	5 -TGCTTGTTTCGCTCTATCTCC-3
NQO-1	Adelante	5 -CATCATTTGGGCAAGTCC-3
	Contrarrestar	5 -ACAGCCGTGGCAGAACTA-3
iNOS	Adelante	5 -ACCACTCGTACTTGGGATGC-3
	Contrarrestar	5 -CACCTTGGAGTTACCCAGT-3
IL-1	Adelante	5 -TGTGATGTTCCCATTAGAC-3
	Contrarrestar	5 -AATACCACTTGTGGCTTA-3
IL-6	Adelante	5 -CCCAACTTCCAATGCTTCCCTAAT-3
	Contrarrestar	5 -GCACACTAGGTTTGCCGAGTAGACC-3
TNF-	Adelante	5 -GTGATCGGTCCCAACAAG-3
	Contrarrestar	5 -ATCGGGTGCAGCATCGTT-3
MCP-1	Adelante	5 -CTCTCTTCTCCACCACTATGC-3
	Contrarrestar	5 -GTGGGGCATTAACTGCATCTG-3
MIP-1	Adelante	5 -TCCACCACTGCCCTTGCT-3
	Contrarrestar	5 -CGTCCATAGGAGAAGCAGCA-3
TGF-1	Adelante	5 -CTCCCGTGGCTTCTAGTGC-3
	Contrarrestar	5 -GCCTTAGTTTGACAGGATCTG-3
FGF7	Adelante	5 -TCTATAATGCGCAATGGATACTGA-3
	Contrarrestar	5 -CGAGGTGGAAGCACGGTCT-3
VEGF	Adelante	5 -GGGCTGCTGCAATGATGAA-3
	Contrarrestar	5 -TCCGCATGATCTGCATAGTGA-3
-SMA	Adelante	5 -AGCATCCGACCTTGCTAACG-3
	Contrarrestar	5 -CATACATGGCAGGGACATTGAA-3
Col-1	Adelante	5 -GTGGAATGATGGTGCTACT-3
	Contrarrestar	5 -TTAGCACCAGTGTCTCCTTT-3
GAPDH	Adelante	5 -GTATTGGGCGCCTGGTCACC-3
	Contrarrestar	5 -CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG-3

a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de NOx han expresado en mol/L [17]. Los niveles de nitrotirosina sérica se determinaron mediante un kit ELISA (Immundiagnostik AG, Bensheim, Alemania) [18]. Concentraciones de nitrotirosina se han expresado en nM.

2.7. Niveles séricos de estrés oxidativo. Medición de suero Se midieron los niveles de metabolitos reactivos de oxígeno (ROM) utilizando la cuantificación fotométrica como se informó anteriormente [19], según las instrucciones del fabricante (Diacron International, Grosseto, Italia). Las pruebas de ROM se expresan en términos relativos. unidades, donde una unidad Carratelli (CARR U) es equivalente a 0,08 mg/dL de una solución de peróxido de hidrógeno. Para determinar la capacidad antioxidante sérica total, el adsorbente OXY Las pruebas se realizaron con un espectrofotómetro (Diacron International) para todas las muestras [19]. Esta prueba evalúa la capacidad del suero para oponerse a la acción oxidativa masiva de una solución de ácido hipocloroso (HClO); antioxidante total la capacidad se expresó en términos de HClO consumido por 1 mL de muestra (l mol HClO/mL).

2.8. Niveles séricos de citocinas proinflamatorias. Todo el suero las muestras analizadas en busca de citocinas proinflamatorias se filtraron a través de un filtro giratorio de 0,22 m. Se utilizaron kits basados en microesferas multiplex (Bio Rad) para medir las concentraciones de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF-) en suero. El Las citocinas se midieron en una placa de 96 pozos usando 50 L de suero por pocillo. Los patrones y las muestras se ensayaron en un sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad); Las placas se lavaron con el Estación de lavado Bio-Plex Pro (Bio-Rad) para perlas magnéticas como informado anteriormente [20]. Las muestras fueron analizadas y estándar las curvas se generaron utilizando la versión Bio-Plex Manager Software 5.0 (Bio-Rad).

2.9. Análisis estadístico. Todos los datos se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM). Para el análisis estadístico, las diferencias entre grupos se analizaron con la prueba de Mann Whitney usando IBM SPSS statistics versión 19 (SPSS Inc., Tokio, Japón). Se consideró un valor inferior a 0,05 Estadísticamente significativo. Se tomó un tamaño de muestra de 6 por grupo. necesarios para detectar diferencias significativas basadas en los resultados de un estudio previo [21].

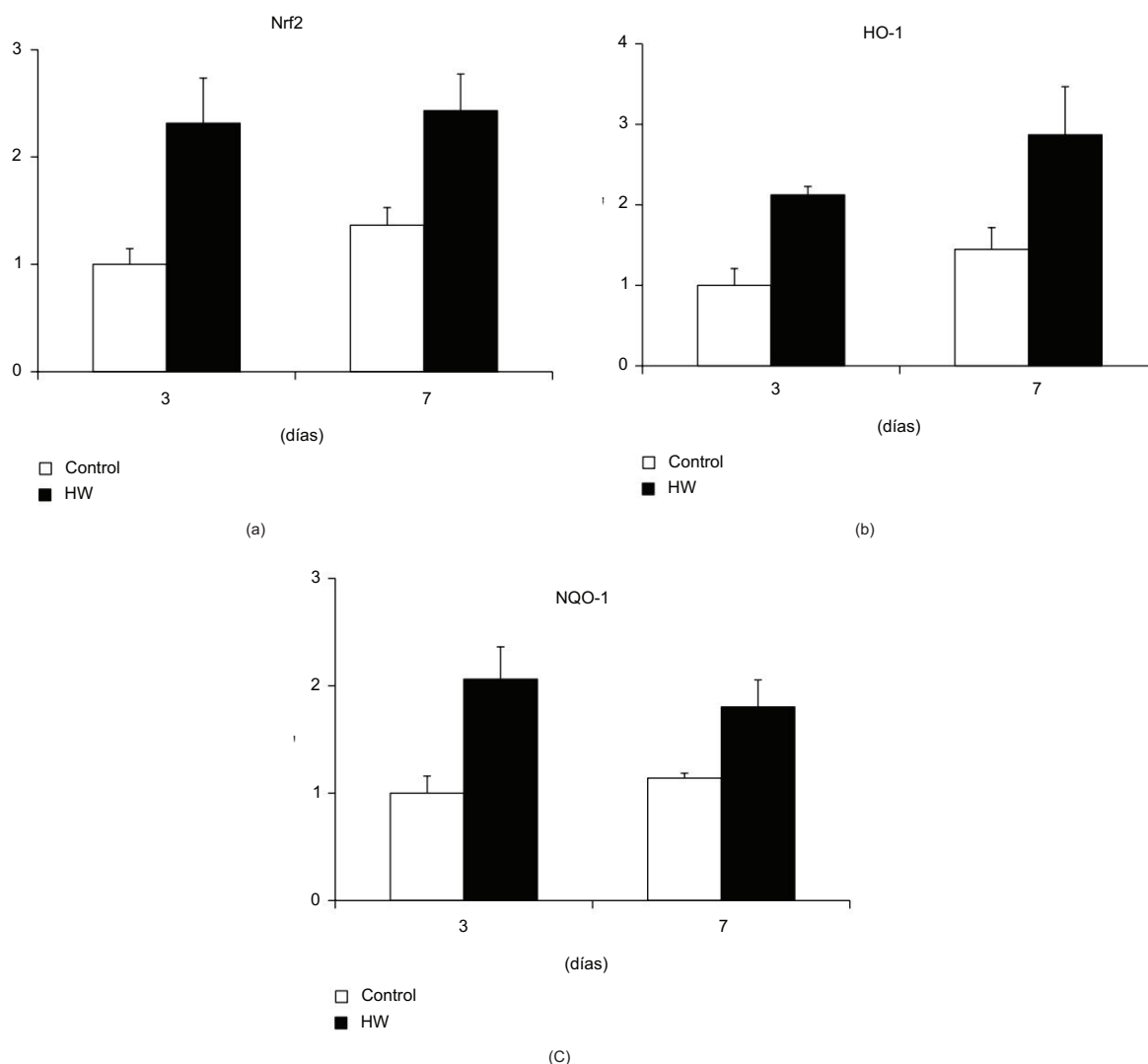


Figura 2: Efectos del agua rica en hidrógeno en la expresión de genes implicados en la vía de defensa antioxidante/Nrf2 en tejido palatino de rata. Los niveles relativos de ARNm de (a) Nrf2, (b) HO-1 y (c) NQO-1 se determinaron mediante PCR en tiempo real. Las barras representan los niveles de expresión de ARNm normalizados a los niveles de GAPDH y en relación con el grupo de control a los 3 días. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p$  < 0,05, \*\* $p$  < 0,01: (=6). significativamente diferente del grupo de control en cada punto de tiempo.

### 3. Resultados

#### 3.1. Cierre de heridas palatinas y características generales.

No hubo diferencias significativas entre los grupos con respecto al consumo de alimentos, peso corporal o patrones de crecimiento durante el período experimental. En las Figuras 1(a), 1(b) y 1(c) se muestran fotografías de la creación y curación de heridas palatinas en ratas. En este modelo, el examen clínico de las heridas mostró una curación gradual en función del tiempo en todos los grupos. En la Figura 1(d) se muestra el curso temporal del cierre de la herida del paladar para cada grupo a los 1, 2, 3 y 7 días después del tratamiento. No hubo diferencias significativas entre los grupos a 1 y 2 días. Sin embargo, las tasas de cierre de heridas del grupo HW fueron significativamente más altas que las del grupo control a los 3 y 7 días después del tratamiento ( $p$  < 0,01).

Se observó una aceleración del proceso de cicatrización de heridas en el grupo HW, que consumió agua rica en hidrógeno.

3.2. Efectos del agua rica en hidrógeno en la ruta de defensa Nrf2/antioxidante. Los niveles de expresión de ARNm de Nrf2 fueron significativamente más altos en el tejido palatino de rata con ingesta de agua rica en hidrógeno que en el tejido palatino del grupo de control ( $p$  < 0,05) (Figura 2(a)). El grupo HW a los 7 días después del tratamiento mostró un aumento adicional en la expresión de Nrf2 frente a los 3 días (Figura 2 (a)). Además, la expresión de ARNm de HO-1 había aumentado significativamente a los 3 y 7 días después del tratamiento ( $p$  < 0,05;  $p$  < 0,01) (Figura 2(b)). Los niveles de expresión de ARNm de NQO-1, que se sabe que es inducido por Nrf2, fueron notablemente más altos en

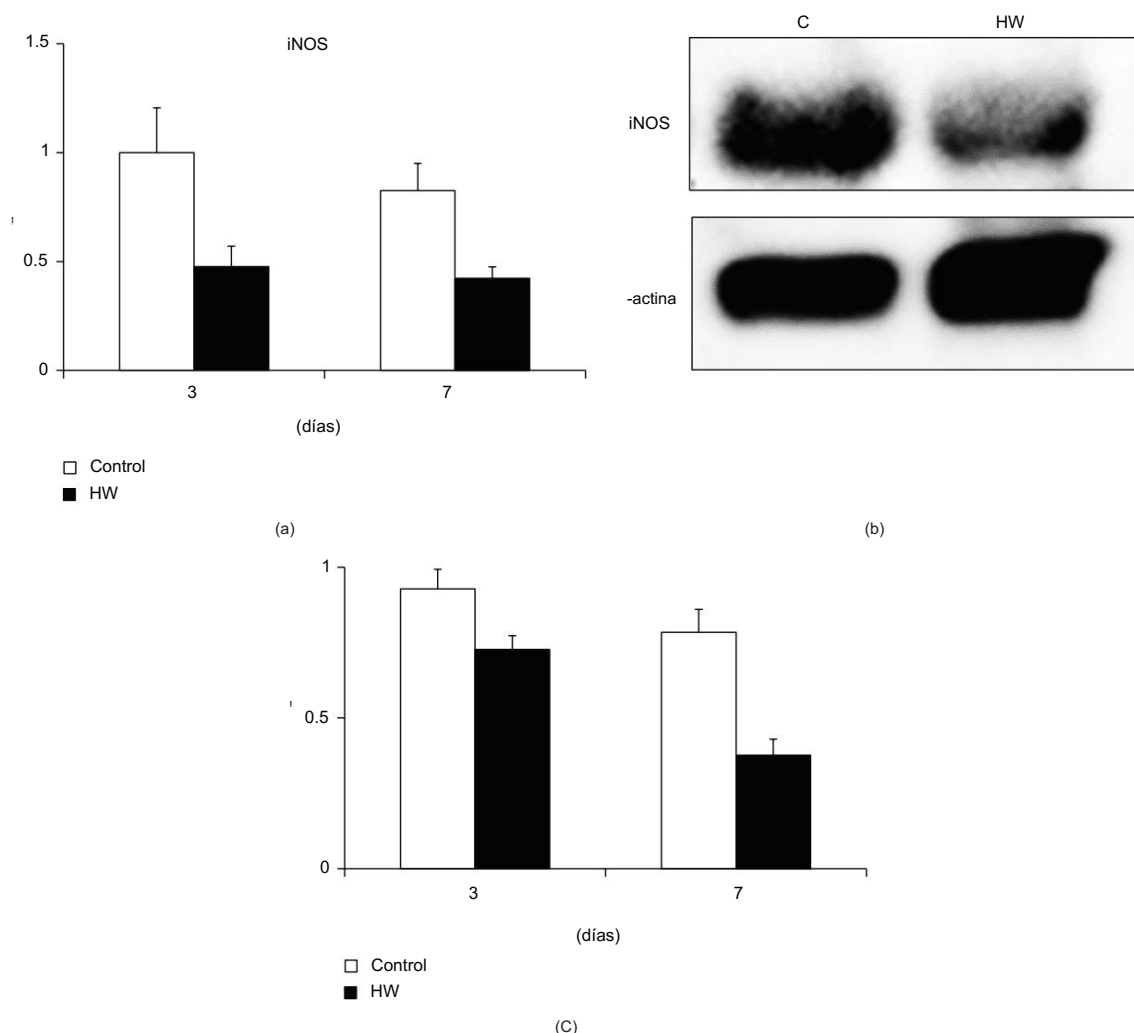


Figura 3: Efectos del agua rica en hidrógeno sobre la expresión de iNOS en tejido palatino de rata. ( a ) Los niveles relativos de ARNm de iNOS se detectaron mediante PCR en tiempo real. Las barras representan los niveles de expresión de ARNm normalizados a los niveles de GAPDH y en relación con el grupo de control a los 3 días. ( b ) Se muestran transferencias de Western representativas para iNOS y -actina. ( c ) Los resultados de la densitometría para las bandas (iNOS) se normalizaron a los de -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ).  $<0.05$ ,  $<0.01$ : significativamente diferente del grupo de control en cada momento.

el grupo HW que en el grupo control tanto a los 3 como a los 7 días ( $<0.01$ ) (Figura 2(c)). Estos datos sugieren que la ingesta de agua rica en hidrógeno promovió la regulación positiva de la expresión de genes de defensa antioxidante al activar la vía Nrf2.

**3.3. Efectos del agua rica en hidrógeno sobre iNOS en tejido palatino de rata.** La expresión de ARNm de iNOS en ratas con ingesta de agua rica en hidrógeno fue menor que en el grupo de control a los 3 y 7 días después del tratamiento ( $<0.05$ ) (Figura 3(a)). El análisis de transferencia Western indicó que la expresión de la proteína iNOS se atenuó en el grupo HW (Figura 3 (b)). Además, las ratas del grupo HW mostraron una expresión de proteína iNOS significativamente suprimida a los 3 y 7 días después del tratamiento ( $<0.05$ ;  $<0.01$ ) (Figura 3(c)). En conjunto, los resultados indican que la activación de la vía de defensa antioxidante/Nrf2 redujo la expresión de iNOS en tejido palatino de rata.

**3.4. Niveles de biomarcadores de estrés oxidativo y nitrosativo en suero.** Evaluamos si la ingesta de agua rica en hidrógeno

Estrés nitrosativo sistémico regulado. Los niveles de biomarcadores de estrés nitrosativo, como NOx, fueron notablemente más bajos en ratas con ingesta de agua rica en hidrógeno que en ratas de control a los 3 y 7 días después del tratamiento ( $<0.01$ ) (Figura 4(a)). Además, los niveles séricos de nitrotirosina disminuyeron significativamente en el grupo HW a los 3 y 7 días ( $<0.05$ ;  $<0.01$ ) (Figura 4(b)).

Para evaluar los efectos del agua rica en hidrógeno sobre el estrés oxidativo sistémico, medimos biomarcadores de estrés oxidativo, como ROM y OXY. Los niveles séricos de ROM, un biomarcador confiable de ROS circulante, se redujeron significativamente con la ingesta de agua rica en hidrógeno a los 3 y 7 días después del tratamiento ( $<0.05$ ;  $<0.01$ ) (Figura 4(c)). Además, los niveles de capacidad antioxidante, como OXY en el grupo HW, fueron marcadamente más altos que los del grupo control a los 3 y 7 días después del tratamiento ( $<0.05$ ;  $<0.01$ ) (Figura 4(d)). Estos resultados indican que la ingesta de agua rica en hidrógeno redujo el estrés oxidativo y nitrosativo sistémico mediante la activación de la actividad antioxidante.

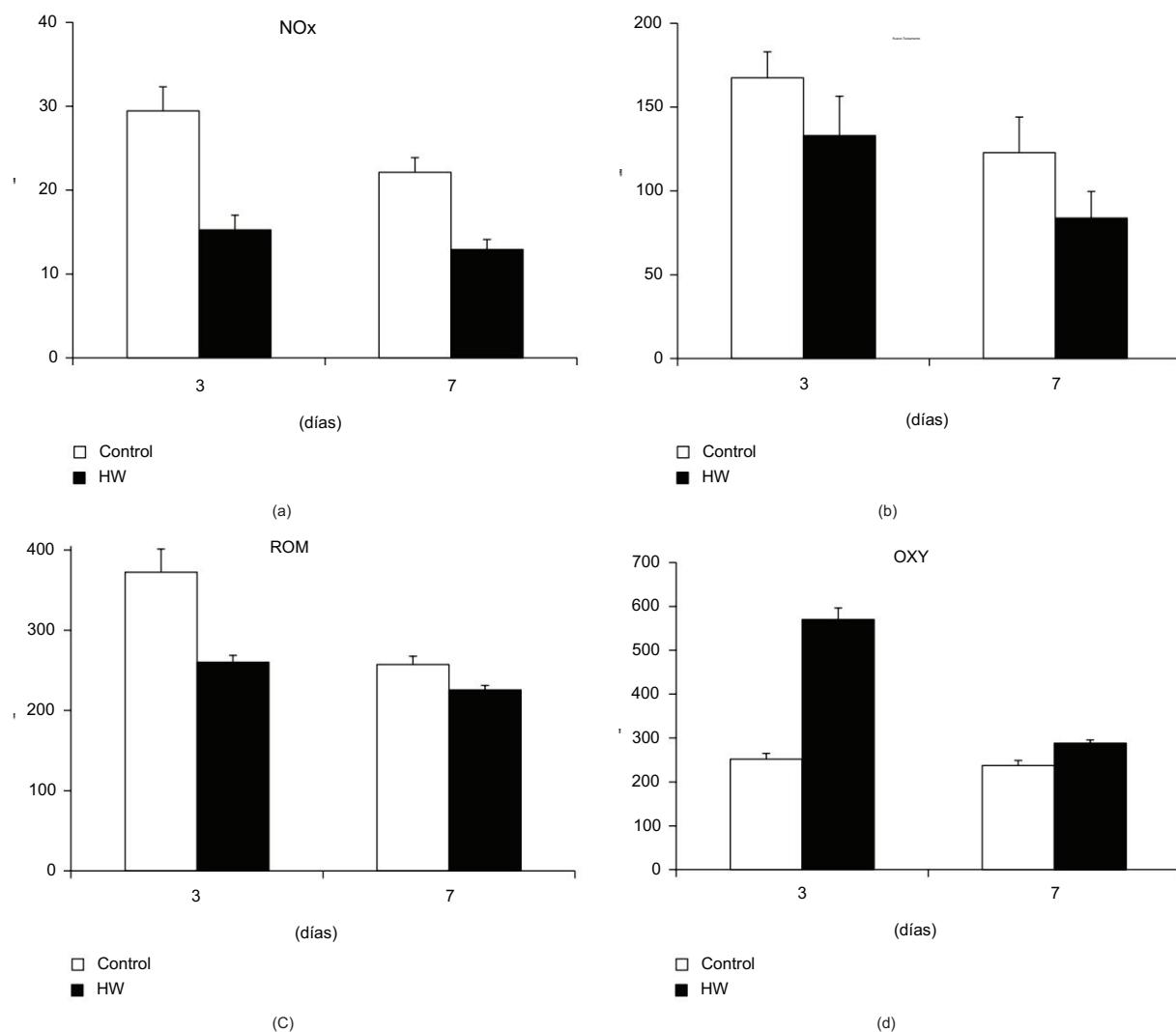


Figura 4: Niveles de biomarcadores de estrés oxidativo y nitrosativo en suero. (a) el NOx se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico de nitrato/nitrito utilizando la reacción de Griess y (b) la nitrorosina (NT) se cuantificó mediante ELISA. (c) ROM y (d) OXY se cuantificaron mediante cuantificación fotométrica. Los datos se expresan como medias  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). \* < 0,01: significativamente diferente del grupo de control en cada momento < 0,05, punto.

3.5. Efectos del agua rica en hidrógeno sobre las citocinas y quimiocinas proinflamatorias en tejido palatino de rata. Usando PCR en tiempo real, encontramos que el grupo HW tenía niveles de expresión de citocinas proinflamatorias más bajos en tejido palatino de rata que el grupo de control (Figuras 5 (a), 5 (b) y 5 (c)). Específicamente, la expresión de IL-6 y TNF- fue significativamente menor a los 3 y 7 días después del tratamiento (< 0,05; < 0,01) (Figuras 5(b) y 5(c)). Por el contrario, los niveles de expresión de quimiocinas en el grupo HW solo se suprimieron significativamente a los 3 días (< 0,05) (Figuras 5(d) y 5(e)). Estos resultados indican que la ingesta de agua rica en hidrógeno suprimió la expresión de citocinas y quimiocinas inflamatorias.

3.6. Efectos del agua rica en hidrógeno sobre la expresión de genes asociados a la curación en tejido palatino de rata. La expresión génica de TGF-1, FGF7, VEGF y -SMA fue mayor en el grupo HW que en el grupo control 3 días después

tratamiento (< 0,05) (Figuras 6(a), 6(b), 6(c) y 6(d)). El grupo HW exhibió una expresión significativamente aumentada de ARNm de FGF7 en comparación con el grupo de periodontitis a los 3 y 7 días después del tratamiento (< 0,05; < 0,01) (Figura 6(b)). Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de colágeno tipo 1 entre los grupos, se observaron niveles limítrofes significativamente más altos en el grupo HW a los 3 días (Figura 6(e)). Estos datos sugieren que la ingesta de agua rica en hidrógeno promueve la expresión de genes asociados con la curación en el tejido palatino de rata.

3.7. Efectos del agua rica en hidrógeno sobre los niveles sistémicos de citocinas proinflamatorias. Los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- se analizaron utilizando un sistema basado en microesferas multiplex. En ratas que bebieron agua rica en hidrógeno, los niveles séricos de IL-1, IL-6 y TNF- fueron significativamente más bajos que los del grupo de control a los 3



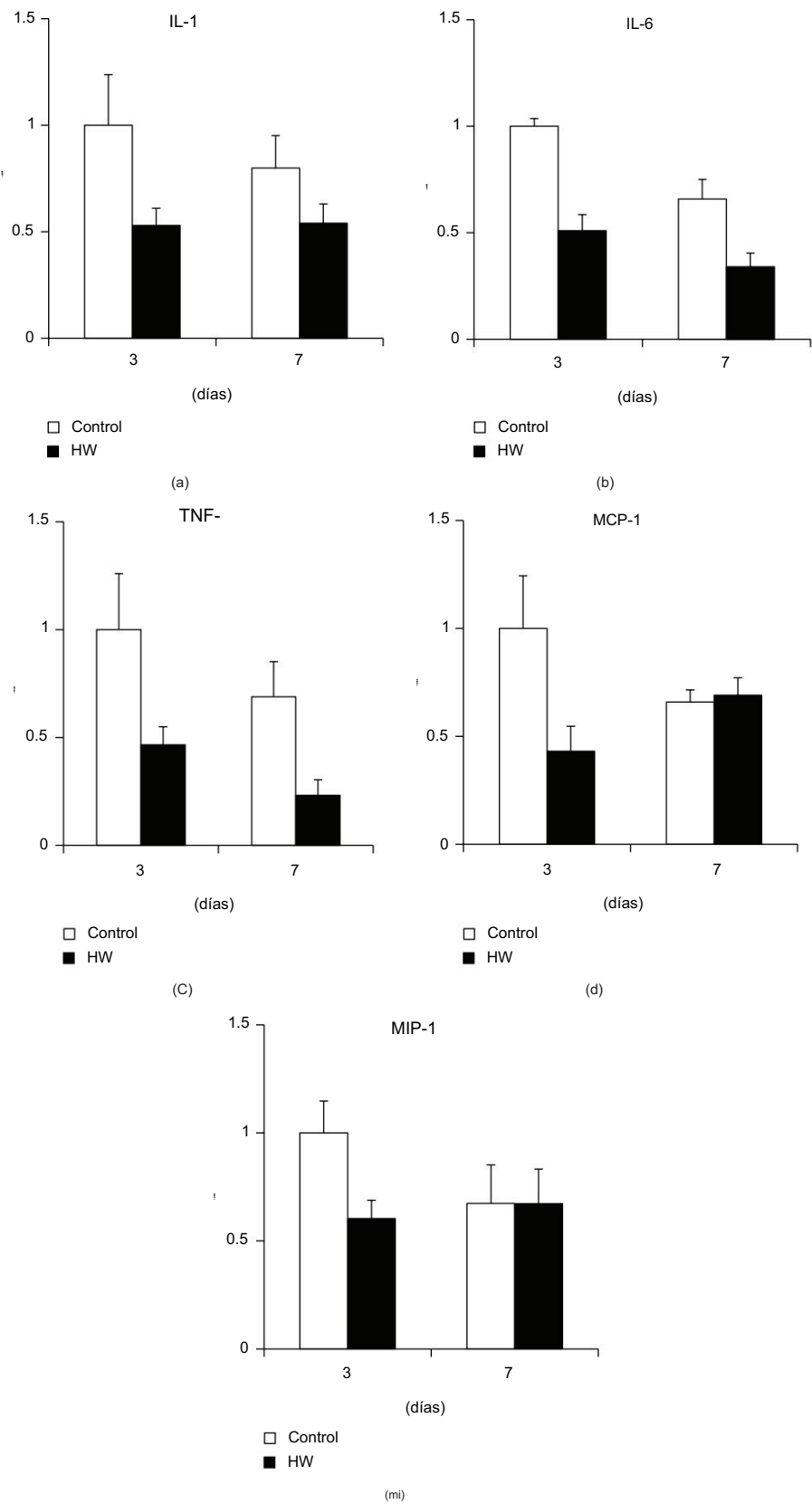


Figura 5: Efectos del agua rica en hidrógeno sobre la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en tejido palatino de rata. ARNm relativo se detectaron niveles de (a) IL-1, (b) IL-6, (c) TNF-, (d) MCP-1 y (e) MIP-1 mediante PCR en tiempo real. Las barras representan los niveles de expresión de ARNm normalizado a los niveles de GAPDH y en relación con el grupo de control a los 3 días después del tratamiento. Comparaciones dentro de cada punto de tiempo a los 3 y 7 días son exhibidos. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM (n=6).  $< 0,01$ : significativamente diferente del grupo de control en cada momento.



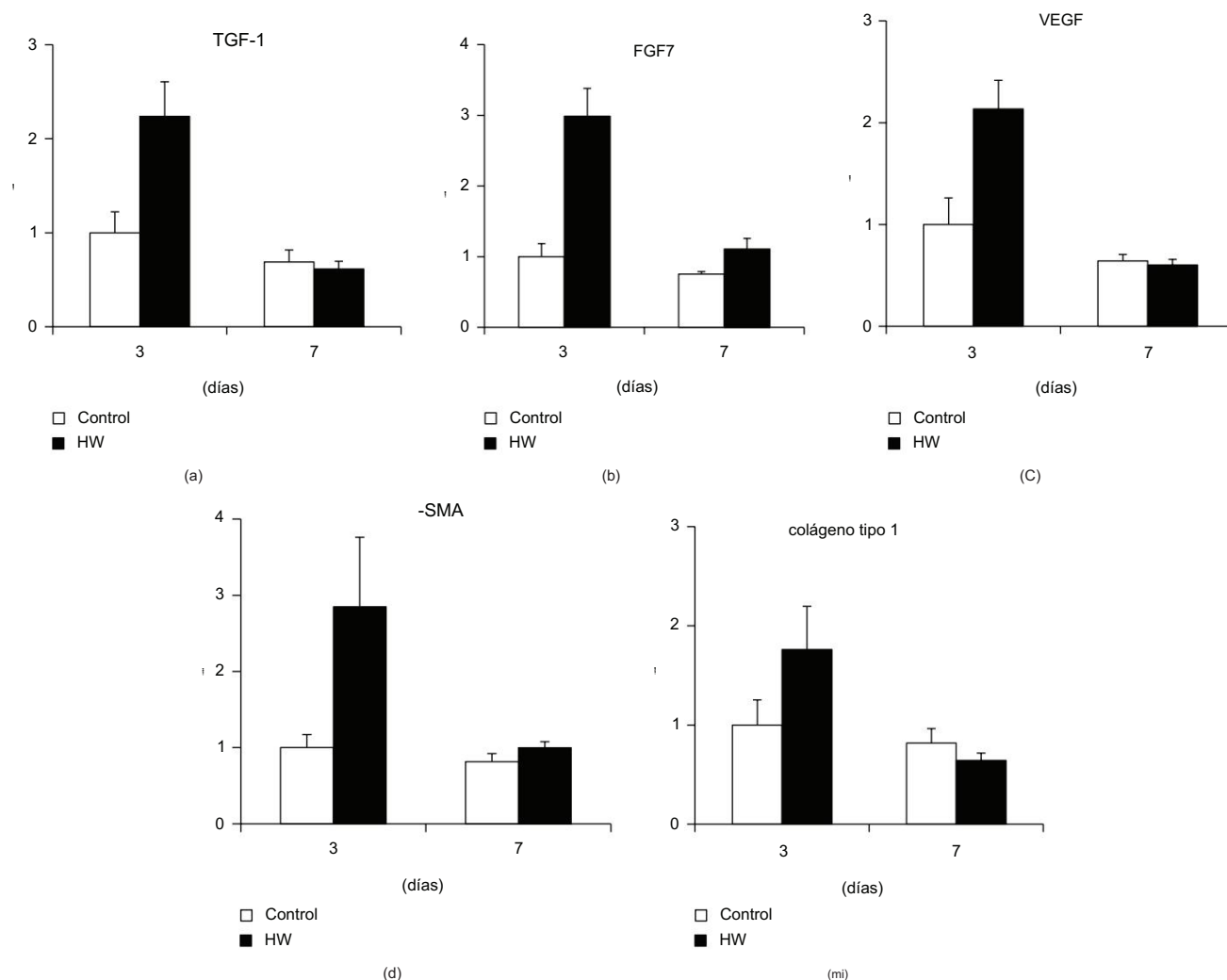


Figura 6: Efectos del agua rica en hidrógeno sobre la expresión de genes asociados a la curación en tejido palatino de rata. Se detectaron niveles relativos de ARNm para (a) TGF-1, (b) FGF7, (c) VEGF, (d) -SMA y (e) colágeno tipo 1 mediante PCR en tiempo real. Las barras representan los niveles de expresión de ARNm normalizados a los niveles de GAPDH y en relación con el grupo de control 3 días después del tratamiento. Se muestran las comparaciones dentro de cada punto de tiempo a los 3 y 7 días. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). <0.05, <0.01: significativamente diferente del grupo de control en cada momento.

días después del tratamiento (<0.05; <0.01) (Figura 7). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-1, IL-6 y TNF- entre los grupos; se observó una tendencia hacia niveles más bajos en el grupo HW a los 7 días (Figura 7). Estos datos sugieren que el agua rica en hidrógeno reduce los niveles sistémicos de citocinas proinflamatorias.

#### 4. Discusión

La escisión palatina utilizada para herir a las ratas en este estudio se eligió por su reproducibilidad clínica. Muchos estudios utilizaron este modelo para investigar la cicatrización de heridas intraorales o los factores que podrían afectarla. Además, demostramos que el proceso de cicatrización de heridas se aceleró con la administración de agua rica en hidrógeno. Para dilucidar los mecanismos de cicatrización de heridas, nos centramos en los efectos antioxidantes y antiinflamatorios del hidrógeno molecular en el modelo de herida palatina de rata. Promoción de la ingesta de agua rica en hidrógeno

la regulación al alza de los genes de defensa antioxidante a través de la activación de la vía Nrf2 y la consiguiente reducción de la expresión de iNOS en el tejido palatino. El estrés oxidativo y nitrosativo sistémico disminuyó debido a la activación de la actividad antioxidante por el hidrógeno molecular. Nuestros hallazgos también indicaron que la ingesta de agua rica en hidrógeno redujo los niveles de citoquinas proinflamatorias locales y sistémicas y promovió la expresión de genes asociados con la curación en el tejido palatino de rata. En conjunto, estos resultados demuestran que la ingesta de hidrógeno molecular puede promover el proceso de curación de heridas orales en ratas al activar la vía de defensa Nrf2/antioxidante.

Se sabe que la cicatrización de heridas es un proceso muy ordenado y bien coordinado que implica inflamación, proliferación celular, depósito de matriz y remodelación tisular [22]. La fase inflamatoria se caracteriza por la formación de un coágulo de sangre causado por la ruptura de los vasos sanguíneos y la extravasación de los constituyentes de la sangre. Además, los miembros de la familia de quimiocinas, incluidos MCP-1 y MIP-1, juegan

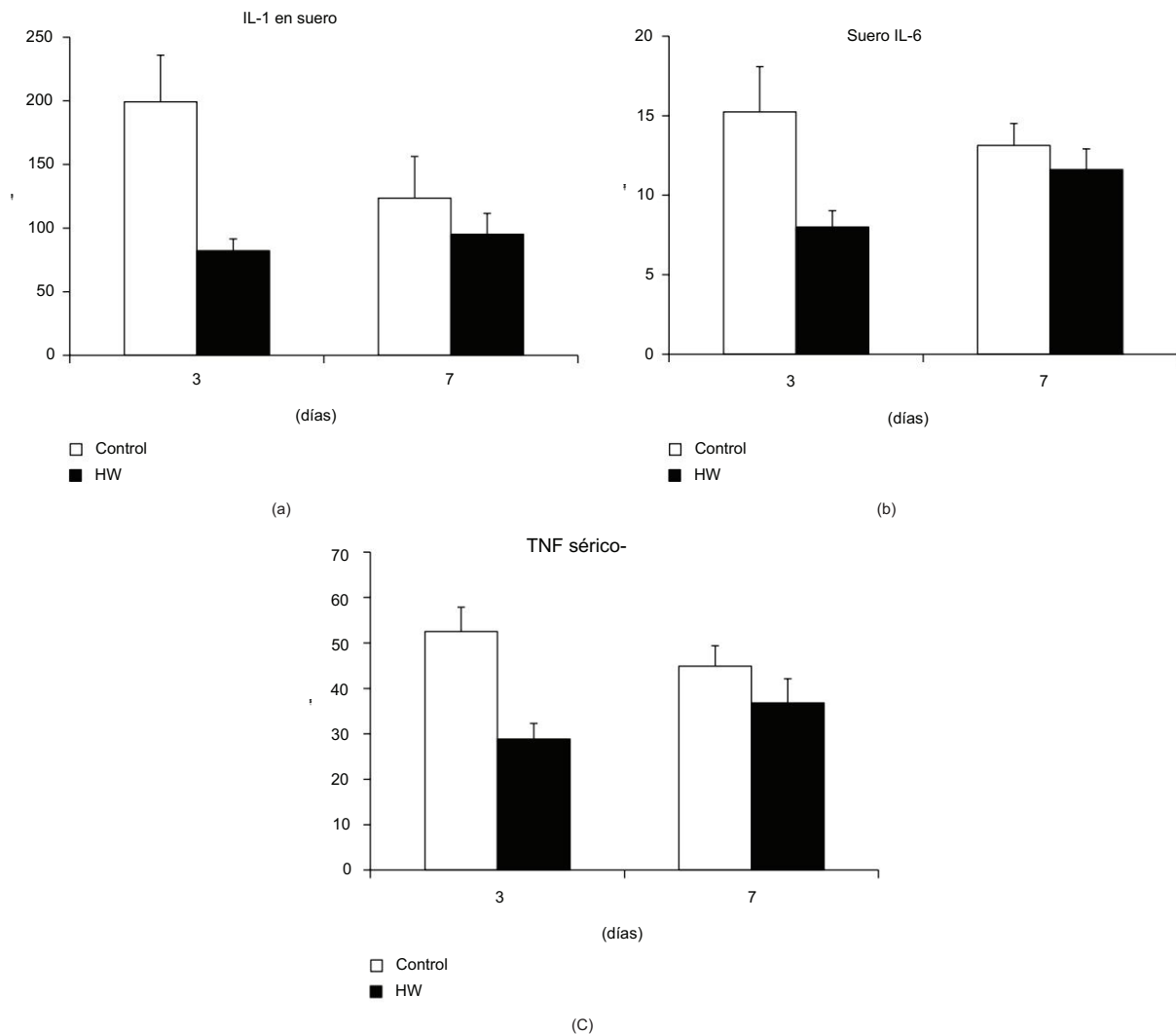


Figura 7: Efectos del agua rica en hidrógeno sobre las concentraciones de citoquinas proinflamatorias en suero. (a) IL-1, (b) IL-6 y (c) TNF- se cuantificaron con un ensayo de microesferas multiplex. Los datos se expresan como media  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). \*  $p < 0,05$ , significativamente diferente del grupo de control en cada momento.

el importante papel de mediar la infiltración de células inflamatorias como monocitos y macrófagos en heridas en proceso de cicatrización [23]. La señalización de TGF también juega un papel importante durante el proceso de cicatrización de heridas. Se descubrió que TGF-1 facilita la expresión de -SMA, un importante mediador de la contracción de heridas [24]. Dado que la señalización de TGF-1 se ha implicado en el depósito de colágeno, el TGF-1 también es importante en múltiples aspectos de la cicatrización de heridas, incluido el crecimiento epitelial, el crecimiento del endotelio vascular y el depósito de colágeno [25]. Se sabe que FGF7 regula genes que codifican mediadores citoprotectores [26] y el factor de transcripción Nrf2, además de las dianas génicas de enzimas antioxidantes de Nrf2 [27]. Curiosamente, una forma recombinante de FGF7 se usa clínicamente en el tratamiento de la mucositis oral [28]. Estos resultados fueron consistentes con los hallazgos mencionados anteriormente; En este estudio, la ingesta de agua rica en hidrógeno suprimió la expresión de las citocinas proinflamatorias MCP-1 y MIP-1, mientras que mejoró la expresión de genes asociados con la curación, como TGF-1, FGF7, VEGF y -SMA.

El hidrógeno molecular es el elemento más simple de la naturaleza y es de interés terapéutico y preventivo debido a sus actividades biológicas, incluidas sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias en la mayoría de los tejidos de animales modelo [9]. Hay una serie de ventajas del hidrógeno como un antioxidante potencial: es lo suficientemente suave como para no perturbar las reacciones redox metabólicas o afectar las ROS, que funciona en la señalización celular, y también tiene características de distribución favorables con respecto a su capacidad física para penetrar biomembranas y difundirse a través de barreras hacia los componentes celulares [6]. También se ha informado que el hidrógeno molecular reduce los niveles de citoquinas proinflamatorias y suprime la inflamación en muchos animales modelo experimentales [9]. Recientemente, se descubrió que el agua rica en hidrógeno, un líquido incoloro e inodoro, posee una fuerte actividad antioxidante y antiinflamatoria [29]. El concepto principal detrás del uso de agua rica en hidrógeno para promover la cicatrización de heridas en este estudio es que el hidrógeno molecular reduce los niveles de ROS y la inflamación. Nuestro presente estudio indica que la administración oral de agua rica en hidrógeno

efectos beneficiosos en un modelo de herida palatina en rata. Es concebible que el hidrógeno molecular administrado por vía oral pueda mejorar el equilibrio redox local así como disminuir el estrés oxidativo circulante.

Aunque hay varias formas de ingerir o consumir hidrógeno molecular, incluida la inhalación de hidrógeno gaseoso, los enfoques preferidos son beber agua disuelta en hidrógeno (agua rica en hidrógeno) e inyectar solución salina disuelta en hidrógeno. Debido a que la inhalación de hidrógeno gaseoso o la inyección de solución salina disuelta en hidrógeno pueden ser inadecuadas o poco prácticas para el consumo continuo de hidrógeno molecular en la vida diaria para uso preventivo, decidimos examinar el consumo de agua rica en hidrógeno en nuestro presente estudio. El agua rica en hidrógeno es un medio particularmente prometedor para ingerir hidrógeno molecular, ya que es portátil, fácil de administrar, segura y no afecta el sabor, el olor o el pH de los alimentos y bebidas.

El agua rica en hidrógeno se puede obtener por varios métodos: inyectando hidrógeno gaseoso en el agua a alta presión, electrolizando el agua para producir hidrógeno y haciendo reaccionar metal o hidruro con agua. Estos métodos podrían ser útiles para la aplicación no solo al agua sino también a otros disolventes. Dado que el hidrógeno molecular es una molécula muy pequeña, se pierde fácilmente y penetra en las paredes de vidrio y plástico de cualquier recipiente en poco tiempo. Por lo tanto, se tuvo que preparar agua rica en hidrógeno todos los días para este estudio. En consecuencia, preparamos agua rica en hidrógeno justo antes de la administración y cambiamos el agua dos veces al día en un recipiente de vidrio cerrado equipado con una línea de salida que contenía dos cojinetes de bolas, lo que evitaba que el agua se desgasificara.

Nrf2 es el principal regulador de los elementos de respuesta antioxidante y modula la expresión de genes de defensa asociados con la protección contra lesiones y enfermedades [30]. El Nrf2 activado en el citoplasma se traslada al núcleo, donde se une a los promotores y aumenta la expresión de enzimas de fase 2 como HO-1 y NQO-1. Curiosamente, se ha informado que el sistema de defensa mediado por Nrf2 juega un papel crucial en la cicatrización de heridas en algunos tejidos [27, 31]. Además, también se sugirió que HO-1, una enzima antiinflamatoria y antioxidante, está asociada con la cicatrización de heridas en humanos [32]. Se aprecia que la expresión de HO-1 cataliza el hemo en cantidades equimolares de biliverdina (reducida posteriormente a bilirrubina a través de la biliverdina reductasa), que libera hierro ferroso y monóxido de carbono [33], regulando así negativamente la iNOS a través de la inactivación de iNOS mediada por monóxido de carbono y la inhibición de la transcripción de iNOS por iones de hierro ferroso [34]. La evidencia acumulada recientemente sugiere que el hidrógeno molecular promueve la regulación positiva de Nrf2 en el tejido pulmonar [8]. Además, la mejora de la expresión de Nrf2 inducida por hidrógeno aumentó significativamente la expresión de HO-1 y NQO-1 [8]. Como se demostró que la ingesta de agua rica en hidrógeno activa la vía Nrf2/antioxidante, medimos la expresión de Nrf2, HO-1, NQO-1 e iNOS. En nuestro experimento, se observó una mejora de la expresión de Nrf2 en el tejido palatino de las ratas a las que se les administró agua rica en hidrógeno. Además, la activación de Nrf2 elevó la expresión de HO-1 y NQO-1 y redujo la expresión de iNOS, según se determinó mediante PCR en tiempo real y transferencia Western de muestras de tejido palatino.

Se informa que el marcador de sangre periférica ROM es útil como un indicador confiable de ROS circulante [35]. El análisis de ROM ayuda a determinar la capacidad oxidante general en la sangre, que a su vez refleja el nivel de ROS a partir del cual se formaron. Varios estudios han indicado la existencia de una relación entre los niveles sistémicos de

ROM y los estados patológicos sistémicos. Debido a la inflamación, los niveles séricos de ROM también aumentan en los pacientes con periodontitis [36]. Además, la administración de agua rica en hidrógeno disminuye el ROM sistémico inducido por la periodontitis, lo que a su vez inhibe la inflamación [26]. Se sabe que los niveles de NO y nitrotirosina aumentan significativamente en heridas y tejidos lesionados [37].

El NO, que es producido por la óxido nítrico sintasa a través de la oxidación de la L-arginina, es un mensajero secundario involucrado en varios procesos fisiopatológicos y se oxida fácilmente a nitrito (NO<sub>2</sub>). Además, el NO<sub>2</sub> puede oxidarse a nitrato (NO<sub>3</sub>). Los niveles totales de nitrito y nitrato en sangre se utilizan generalmente para monitorear el NOx [38]. Además, el peroxinitrito, un oxidante altamente reactivo formado por la combinación de óxido nítrico y superóxido, puede nitrosilar residuos de tirosina de proteínas para producir residuos de nitrotirosina. Recientemente, se han puesto a disposición varios métodos para evaluar el estado antioxidante total en la sangre. En este estudio, la capacidad antioxidante sistémica se midió mediante estimación espectrofotométrica utilizando la prueba de adsorción OXY, que prueba la capacidad de la muestra para oponerse a la acción oxidativa masiva de una solución de ácido hipocloroso [39]. Los datos de este estudio mostraron que la administración oral de agua rica en hidrógeno activó notablemente la capacidad antioxidante y, en consecuencia, redujo el estrés oxidativo y nitrosativo sistémico. Por lo tanto, es posible que el hidrógeno molecular acelere el proceso de cicatrización de heridas al inhibir el estrés oxidativo y nitrosativo sistémico.

Este estudio tiene una limitación. Si bien se tomaron fotografías clínicas de las heridas palatinas con una cámara digital, no se presentó ningún análisis histológico o inmunohistoquímico utilizando un microscopio óptico. Se necesitarían más investigaciones detalladas, como análisis histológicos, para definir cómo el agua rica en hidrógeno modula las heridas palatinas para mejorar la confiabilidad de nuestra noción.

## 5. Conclusiones

En conclusión, beber agua rica en hidrógeno exhibió múltiples efectos beneficiosos en el modelo de herida palatina en rata a través de la activación de la vía de defensa Nrf2/antioxidante.

Los resultados de este estudio respaldan la hipótesis de que la administración oral de agua rica en hidrógeno sería beneficiosa durante el proceso de cicatrización de heridas al disminuir el estrés oxidativo y las respuestas inflamatorias.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la publicación de este estudio.

## Reconocimiento

Este trabajo fue apoyado en parte por subvenciones para la investigación científica (núms. 15K11418, 26463164 y 26293442)

del Ministerio de Educación, Cultura, Deportes, Ciencia y Tecnología de Japón.

## Referencias

- [1] AD Le, DL Basi y AO Abubaker, "Curación de heridas: hallazgos de la cumbre de investigación de la AAOMS de 2005", *Revista de cirugía oral y maxilofacial*, vol. 63, núm. 10, págs. 1426–1435, 2005.
- [2] F. Yoshino, A. Yoshida, A. Nakajima, S. Wada-Takahashi, S. Takahashi y MC-I. Lee, "Alteración del estado redox con especies reactivas de oxígeno para la mucositis oral inducida por 5-fluorouracilo en hámsteres", *PLoS ONE*, vol. 8, núm. 12, artículo ID e82834, 2013.
- [3] S. Arikan, C. Durusoy, N. Akalin, A. Haberal y D. Seckin, "Estado oxidante/antioxidante en la estomatitis aftosa recurrente" *Enfermedades bucales*, vol. 15, núm. 7, págs. 512 a 515, 2009.
- [4] ILC Chapple y JB Matthews, "El papel del oxígeno reactivo y las especies antioxidantes en la destrucción del tejido periodontal". *Periodoncia* 2000, vol. 43, núm. 1, págs. 160 a 232, 2007.
- [5] M. Baggiolini y MP Wymann, "Encender el estallido respiratorio", *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 15, núm. 2, págs. 69–72, 1990.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] T. Kawamura, N. Wakabayashi, N. Shigemura et al., "El gas de hidrógeno reduce la lesión pulmonar hiperóxica a través de la vía Nrf2 in vivo" *American Journal of Physiology—Lung Cellular and Molecular Physiology*, vol. 304, núm. 10, págs. L646–L656, 2013.
- [9] S. Ohta, "Hidrógeno molecular como gas médico preventivo y terapéutico: iniciación, desarrollo y potencial de la medicina del hidrógeno", *Farmacología y terapéutica*, vol. 144, núm. 1, págs. 1 a 11, 2014.
- [10] S. Watanabe, M. Fujita, M. Ishihara et al., "Efecto protector de la inhalación de gas hidrógeno en la dermatitis inducida por radiación y lesiones cutáneas en ratas", *Journal of Radiation Research*, vol. 55, núm. 6, págs. 1107–1113, 2014.
- [11] L. Yang, CG Engeland y B. Cheng, "El aislamiento social afecta la cicatrización de heridas en el paladar oral en ratas sprague-dawley: un papel para miR-29 y miR-203 a través de la supresión de VEGF", *PLoS ONE*, vol. 8, núm. 8, artículo ID e72359, 2013.
- [12] D. Kawai, A. Takaki, A. Nakatsuka et al., "El agua rica en hidrógeno previene la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica y la hepatocarcinogénesis acompañante en ratones", *Hepatología*. vol. 56, núm. 3, págs. 912–921, 2012.
- [13] YJ Kim, FC Carvalho, JAC Souza et al., "La aplicación tópica de la lectina Artin M acelera la cicatrización de heridas en la mucosa oral de rata al mejorar la producción de TGF-beta y VEGF". *Reparación y regeneración de heridas*, vol. 21, núm. 3, págs. 456–463, 2013.
- [14] T. Ishibashi, B. Sato, M. Rikitake et al., "El consumo de agua que contiene una alta concentración de hidrógeno molecular reduce el estrés oxidativo y la actividad de la enfermedad en pacientes con artritis reumatoide: un estudio piloto de etiqueta abierta", *Medical Gas Research*, vol. 2, núm. 1, artículo 27, 2012.
- [15] T. Seo, R. Kurokawa y B. Sato, "Un método conveniente para determinar la concentración de hidrógeno en el agua: uso de azul de metileno con platino coloidal", *Medical Gas Research*, vol. 2, artículo 1, 2012.
- [16] R. Orihuela-Campos, N. Tamaki, R. Mukai, M. Fukui, J. Terao y H.-O. Ito, "Impactos biológicos del resveratrol, la quercetina y la N-acetilcisteína sobre el estrés oxidativo en los fibroblastos gingivales humanos", *Revista de bioquímica clínica y nutrición*, vol. 56, núm. 3, págs. 220–227, 2015.
- [17] O. Andrukhov, H. Haririan, K. Bertl et al., "Producción de óxido nítrico, inflamación sistémica y metabolismo de lípidos en pacientes con periodontitis: posible aspecto de género", *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 40, núm. 10, págs. 916–923, 2013.
- [18] JM Souza, G. Peluffo y R. Radi, "Nitración de tirosina de proteínas: ¿alteración funcional o solo un biomarcador?" *Biología y medicina de radicales libres*, vol. 45, núm. 4, págs. 357–366, 2008.
- [19] N. Tamaki, H. Hayashida, M. Fukui et al., "Estrés oxidativo y niveles de anticuerpos contra las bacterias periodontales en adultos: el estudio de las Islas Nagasaki", *Oral Diseases*, vol. 20, núm. 3, págs. 49–56, 2014.
- [20] A. Khan, "Detección y cuantificación de cuarenta y ocho citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y nueve proteínas de fase aguda en plasma, saliva y orina humanos sanos", *Journal of Proteomics*, vol. 75, núm. 15, págs. 4802–4819, 2012.
- [21] N. Tamaki, R. Cristina Orihuela-Campos, Y. Inagaki, M. Fukui, T. Nagata y H.-O. Ito, "El resveratrol mejora el estrés oxidativo y previene la progresión de la periodontitis a través de la activación de las vías de defensa Sirt1/AMPK y Nrf2/antioxidante en un modelo de periodontitis en rata", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 75, págs. 222–229, 2014.
- [22] AJ Singer y RAF Clark, "Curación de heridas cutáneas", *The New England Journal of Medicine*, vol. 341, núm. 10, págs. 738–746, 1999.
- [23] P. Martin y SJ Leibovich, "Células inflamatorias durante la reparación de heridas: lo bueno, lo malo y lo feo" *Trends in Cell Biology*, vol. 15, núm. 11, págs. 599–607, 2005.
- [24] N. Yoneda, A. Yasue, T. Watanabe y E. Tanaka, "La regulación descendente de Smad3 acelera la reparación de heridas en el paladar", *Journal of Dental Research*, vol. 92, núm. 8, págs. 716–720, 2013.
- [25] S. Werner y R. Grose, "Regulación de la cicatrización de heridas por factores de crecimiento y citocinas", *Physiological Reviews*, vol. 83, núm. 3, págs. 835–870, 2003.
- [26] M. Jarosz, L. Robbez-Masson, A.-M. Chioni, B. Cruz, I. Rosewell y R. Grose, "El factor de crecimiento de fibroblastos 22 no es esencial para el desarrollo y la reparación de la piel, pero desempeña un papel en la tumorigénesis", *PLoS ONE*, vol. 7, núm. 6, artículo ID e39436, 2012.
- [27] S. Braun, C. Hanselmann, MG Gassmann et al., "Factor de transcripción Nrf2, un objetivo novedoso de la acción del factor de crecimiento de queratinocitos que regula la expresión génica y la inflamación en la curación de heridas en la piel", *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, núm. 15, págs. 5492–5505, 2002.
- [28] R. Spielberger, P. Stiff, W. Bensinger et al., "Palifermin para la mucositis oral después de una terapia intensiva para los cánceres hematológicos", *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, núm. 25, págs. 2590 a 2598, 2004.
- [29] K. Kasuyama, T. Tomofuji, D. Ekuni et al., "El agua rica en hidrógeno atenúa la periodontitis experimental en un modelo de rata" *Revista de Periodoncia Clínica*, vol. 38, núm. 12, págs. 1085–1090, 2011.
- [30] X. Zhai, X. Chen, J. Shi et al., "La lactulosa mejora la lesión por isquemia-reperfusión cerebral en ratas mediante la inducción de hidrógeno mediante la activación de la expresión de Nrf2", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 65, págs. 731 y 741, 2013.

- [31] R. Hayashi, N. Himori, K. Taguchi et al., "El papel del sistema de defensa mediado por Nrf2 en la cicatrización de heridas del epitelio corneal" *Biología y medicina de radicales libres*, vol. 61, págs. 333 y 342, 2013.
- [32] A. Yachie, Y. Niida, T. Wada et al., "El estrés oxidativo provoca una mayor lesión de las células endoteliales en la deficiencia de hemoxygenasa-1 humana", *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 103, núm. 1, págs. 129–135, 1999.
- [33] R. Tenhunen, HS Marver y R. Schmid, "La conversión enzimática de hemo a bilirrubina por hemoxygenasa microsomal" *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América*, vol. 61, núm. 2, págs. 748–755, 1968.
- [34] PK Datta, SB Koukouritaki, KA Hopp y EA Lianos, "La inducción de hemoxygenasc-1 atenúa la níttrica inducible: expresión de óxido sintasa y proteinuria en la glomerulonefritis" *Revista de la Sociedad Americana de Nefrología*, vol. 10, núm. 12, págs. 2540–2550, 1999.
- [35] F. D'Aiuto, L. Nibali, M. Parkar, K. Patel, J. Suvar y N. Donos, "Estrés oxidativo, inflamación sistémica y periodontitis severa", *Journal of Dental Research*, vol. 89, núm. 11, págs. 1241–1246, 2010.
- [36] S. Masi, KD Salpea, K. Li et al., "Estrés oxidativo, inflamación crónica y longitud de los telómeros en pacientes con periodontitis", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 50, núm. 6, págs. 730–735, 2011.
- [37] R. Costa, R. Negrao, I. Valente et al., "Xanthohumol modula la inflamación, el estrés oxidativo y la angiogénesis en la cicatrización de heridas en la piel de ratas diabéticas tipo 1", *Journal of Natural Products* vol. 76, núm. 11, págs. 2047–2053, 2013.
- [38] H. Moshage, B. Kok, JR Huizenga y PLM Jansen, "Determinaciones de nitrito y nitrato en plasma: una evaluación crítica" *Química clínica*, vol. 41, núm. 6, págs. 892–896, 1995.
- [39] N. Tamaki, A. Takaki, T. Tomofuji et al., "La etapa del carcinoma hepatocelular está asociada con la periodontitis", *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 38, núm. 11, págs. 1015–1020, 2011.