

El hidrógeno en el agua potable reduce la dopaminérgica Pérdida neuronal en el modelo de ratón de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina de la enfermedad de Parkinson

kyota fujita¹, Toshihiro Seike¹, Noriko Yutsudo², mizuki ohno², Hidetaka Yamada², Hiroo Yamaguchi², kunihiro sakumi², yukiko yamakawa¹, Mizuho A. Kido³, Atsushi Takaki⁴, Toshihiko Katafuchi⁴, Yoshinori Tanaka⁵, Yusaku Nakabeppu², Mami Noda¹.*

¹ Laboratorio de Fisiopatología, Escuela de Graduados en Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Kyushu, Fukuoka, Japón, ² División de Genómica Neurofuncional, Instituto Médico de Biorregulación, Universidad de Kyushu, Fukuoka, Japón, ³ Departamento de Anatomía Oral y Biología Celular, Escuela de Graduados en Ciencias Dentales, Universidad de Kyushu, Fukuoka, Japón, ⁴ Departamento de Fisiología Integrativa, Escuela de Graduados en Ciencias Médicas, Universidad de Kyushu, Fukuoka, Japón, ⁵ Centro de I+D, Electrodomésticos s Unidad de negocio de fabricación, Panasonic Electric Works Co., Ltd., Osaka, Japón

Abstracto

Se ha demostrado que el hidrógeno molecular (H₂) actúa como un antioxidante terapéutico y suprime la lesión cerebral al amortiguar los efectos del estrés oxidativo. El estrés oxidativo crónico provoca enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP). Aquí, mostramos que beber agua que contiene H₂ redujo significativamente la pérdida de neuronas dopaminérgicas en ratones modelo PD mediante la administración tanto aguda como crónica de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). La dependencia de la concentración de H₂ mostró que H₂ tan bajo como 0,08 ppm tenía casi el mismo efecto que el agua saturada de H₂ (1,5 ppm). La acumulación celular inducida por MPTP de 8-oxoguanina (8-oxoG), un marcador de daño en el ADN, y 4-hidroxinonenal (4-HNE), un marcador de peroxidación lipídica, se redujeron significativamente en la vía dopaminérgica nigro-estriatal en ratones que bebieron agua que contenía H₂, mientras que la producción de superóxido (O₂N²) detectada por inyección intravascular de dihidroetidio (DHE) no se redujo significativamente. Nuestros resultados indicaron que una baja concentración de H₂ en el agua potable puede reducir el estrés oxidativo en el cerebro. Por lo tanto, beber agua que contiene H₂ puede ser útil en la vida diaria para prevenir o minimizar el riesgo de estrés oxidativo y neurodegeneración relacionados con el estilo de vida.

Cita: Fujita K, Seike T, Yutsudo N, Ohno M, Yamada H, et al. (2009) El hidrógeno en el agua potable reduce la pérdida neuronal dopaminérgica en el modelo de ratón con 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina de la enfermedad de Parkinson. PLoS ONE 4(9): e7247. doi:10.1371/journal.pone.0007247

Editor: David C. Rubinsztein, Universidad de Cambridge, Reino Unido

Recibido el 2 de septiembre de 2008; Aceptado el 2 de septiembre de 2009; Publicado el 30 de septiembre de 2009

Derechos de autor: 2009 Fujita et al. Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia de atribución de Creative Commons, que permite el uso, la distribución y la reproducción sin restricciones en cualquier medio, siempre que se acredite al autor original y la fuente.

Financiamiento: Apoyado por Panasonic Electric Works Co., Ltd. y el programa COE global de la Universidad de Kyushu para NY, MO, KS, YN. Los patrocinadores no tuvieron ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y el análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito.

Conflicto de intereses: Los autores han declarado que no existen conflictos de intereses.

* Correo electrónico: noda@phar.kyushu-u.ac.jp

Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo.

Introducción

Se ha informado que el hidrógeno molecular (H₂) reduce selectivamente el radical hidroxilo, el más citotóxico de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y por lo tanto puede proteger eficazmente las células.

Por lo tanto, la inhalación de gas H₂ suprimió fuertemente la lesión cerebral isquémica y por reperfusión [1,2] y el consumo de agua saturada con H₂ (agua H₂) previno las deficiencias inducidas por el estrés en las tareas de aprendizaje durante la restricción física crónica [3] al amortiguar los efectos del estrés oxidativo o la formación de superóxido [4]. El estrés oxidativo, relacionado con el daño mitocondrial, también es una causa principal de la enfermedad de Parkinson (EP) [5–7]. La enfermedad de Parkinson se considera una enfermedad neurodegenerativa intratable con cambios patológicos en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN) y las terminaciones nerviosas dopaminérgicas nigroestriales, lo que provoca trastornos del movimiento como temblores, rigidez y acinesia [8]. El modelo de EP basado en 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) ha sido importante para dilucidar la cascada molecular de la muerte celular en las neuronas dopaminérgicas, así como el descubrimiento de los genes de la EP [9]. El MPTP en sí no es tóxico y, como compuesto lipofílico, puede atravesar la barrera hematoencefálica. Una vez dentro del cerebro, MPTP es

metabolizado en el catión tóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) por la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B) en las células gliales. MPTP tiene una capacidad bastante selectiva para causar muerte neuronal en células dopaminérgicas, aparentemente a través de un proceso de captación de alta afinidad, a través de un transportador de dopamina (DAT) [10], después de haber sido liberado de las células gliales. Dentro de las neuronas dopaminérgicas, MPP⁺ interfiere con el complejo I de la cadena de transporte de electrones, un componente del metabolismo mitocondrial, que conduce a la muerte celular y provoca la acumulación de radicales libres, moléculas tóxicas que contribuyen aún más a la destrucción celular [11].

Hoy en día, los compuestos antioxidantes son ampliamente reconocidos por el potencial tratamiento terapéutico de las enfermedades por estrés oxidativo. Algunos fármacos antioxidantes y materiales antioxidantes en los alimentos se han probado en el modelo de ratón MPTP [12,13]. Los antioxidantes no solo en los alimentos sino también en el agua potable ofrecerían una gran ventaja sobre otras formas de terapia antioxidante. De hecho, se informó que beber agua saturada con H₂ electrolizada mostró un efecto en la reducción del estrés oxidativo en ratas, medido por la guanina oxidada en la orina y el peróxido de lípido hepático [14]. Recientemente también se demostró que beber agua saturada de H₂, en lugar de inhalar gas H₂, previene el deterioro cognitivo al reducir el estrés oxidativo

[3]. Según Nagata et al. [3], incluso en el agua potable, el H₂ puede llegar a la sangre en minutos.

Usando el modelo PD ampliamente aceptado, hemos probado el efecto del agua potable que contiene H₂ en la pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP. Aquí mostramos que beber agua H₂ puede potencialmente ofrecer una gran ventaja sobre otras formas de terapia antioxidante, particularmente para condiciones patológicas crónicas como la EP.

Resultados

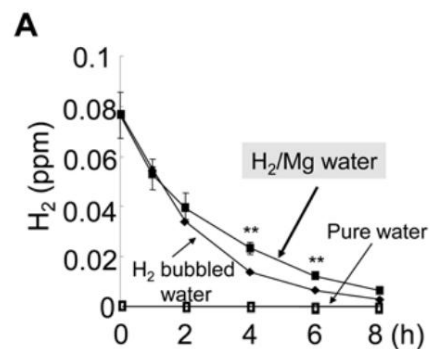
El agua de hidrógeno se obtiene burbujando gas H₂ y usando una reacción electroquímica de magnesio. El agua de hidrógeno

(agua H₂) puede obtenerse mediante varios métodos.

En los presentes experimentos, se probó el agua H₂ hecha de dos maneras relativamente fáciles y seguras. El contenido de H₂ en el agua H₂, elaborado ya sea disolviendo hidrógeno electrolizado en agua pura (agua burbujada con H₂) o utilizando la reacción electroquímica de magnesio con agua (agua H₂/Mg), disminuyó con un tiempo medio de 2 h y casi desapareció después de 8 h (Figura 1). El curso temporal del contenido de H₂ fue similar en agua burbujada con H₂ y agua con H₂/Mg excepto a las 4 y 6 h, lo que sugiere que el H₂ se mantuvo mejor en agua con H₂/Mg, aunque el mecanismo no estaba claro.

El efecto del agua H₂ en la neurotoxicidad aguda de MPTP

Para observar simplemente el efecto del H₂ en el agua potable, se utilizó agua burbujada con H₂ para las pruebas de neurotoxicidad aguda de MPTP. Los ratones recibieron agua H₂ o agua sin H₂ durante 7 días antes de la administración de MPTP y continuaron recibiendo hasta que se sacrificaron los ratones y se extrajeron los cerebros. Dado que el contenido de H₂ desapareció dentro de las 8 h (Figura 1), el suministro de agua se restringió a 8 h por día para que los ratones tomaran la mayor parte del agua durante las primeras horas de cada día. La administración sistémica de MPTP provocó una disminución significativa en el número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc) (38 % después de agua salina y no H₂)



B

	pH
Pure water: H ₂ (-)	5.93
H ₂ water (bubbled)	6.26
H ₂ water (Mg)	8.76
Mg(OH) ₂ water	8.52

Figura 1. Disminución dependiente del tiempo del contenido de H₂ en cada agua de bebida y su pH. El agua de hidrógeno se hizo burbujando directamente gas H₂ producido por electrólisis (agua burbujada con H₂) o reacción química usando Mg (agua H₂/Mg). **P,0,01 en comparación con agua burbujada con H₂. Las barras de error representan la media de 6 SEM. doi:10.1371/journal.pone.0007247.g001

en comparación con los del grupo de inyección de solución salina, como se muestra por el número de células positivas para tirosina hidroxilasa (TH) (Figura 2A). Las fibras dopaminérgicas en la sustancia negra pars reticulosa (SNpr) también se redujeron aparentemente. En ratones tratados con agua H₂, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en SNpc fue aproximadamente la mitad de la de los ratones que bebieron agua sin H₂ (54 % de solución salina y agua sin H₂) y mostró una reducción significativa en la pérdida de neuronas en SNpc (Figura 2B). En los grupos inyectados con solución salina, no hubo efectos aparentes de H₂ en el número de neuronas dopaminérgicas en SNpc (Figura 2A, 2B). Este resultado también fue respaldado por el análisis estereológico, un mejor método para el recuento de células imparcial (Figura 2C, 2D). El número de neuronas positivas para TH disminuyó significativamente con la administración de MPTP.

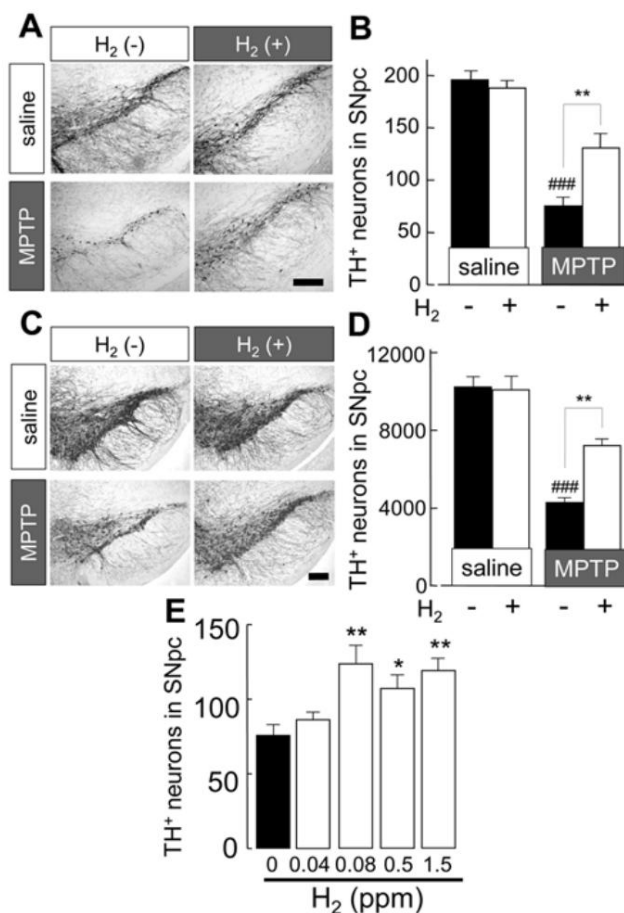


Figura 2. Beber agua con burbujas de H₂ redujo la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra inducida por la inyección aguda de MPTP. (A) Fotomicrografías representativas que ilustran la tinción con tirosina hidroxilasa (TH) en la sustancia negra (SN) de grupos de animales de tratamiento indicados. Tinción de TH de ratones con inyección de solución salina que bebieron agua sin H₂ o agua con burbujas de H₂ y aquellos de ratones inyectados con MPTP que bebieron agua sin H₂ o agua con burbujas de H₂. Escala: 200 μm. (B) Número promedio de neuronas TH-positivas en SN pars compacta (SNpc), medidas en secciones coronales de 20 μm (n = 4–6). (C)

Fotomicrografías representativas que ilustran la inmunoreactividad de TH en el SN de los grupos de animales de tratamiento indicados. La tinción es más intensa que en (A) debido al mayor grosor de la sección (30 μm) requerido para el análisis estereológico. Escala: 200 μm. (D) Cuantificación de neuronas TH-positivas por estereología, como se describe en Materiales y Métodos. (n = 4 cada uno) (E) Neuronas positivas para TH en SN de ratones tratados con 4 concentraciones diferentes de H₂ (0,04, 0,08, 0,5, 1,5 ppm) en agua potable (n = 4–6).

ANOVA unidireccional; ###P,0.001 en comparación con solución salina con agua sin H₂; *P,0.05, **P,0.01 en comparación con MPTP con agua sin H₂. Las barras de error representan la media de 6

SEM. doi:10.1371/journal.pone.0007247.g002

ción, al 40% de los controles (41806309, MPTP y agua no H₂; 103356491, agua salina y no H₂). Sin embargo, beber agua H₂ atenuó significativamente esta disminución de neuronas por MPTP sin ninguna disminución en ratones inyectados con solución salina (71056325, MPTP y agua H₂; 100946716, solución salina y agua H₂). Las observaciones morfológicas también respaldaron una menor disminución de la inmunoreactividad de TH tanto en SNpc como en SNpr. Este riguroso análisis estereológico apoya plenamente los resultados obtenidos utilizando métodos de conteo convencionales. En consecuencia, el efecto protector del H₂ se probó mediante dos métodos de conteo diferentes. Los efectos del agua H₂ dependieron de la dosis, con un efecto máximo a una concentración mucho más baja (0,08 ppm) que la concentración saturada de H₂ (1,5 ppm) (Figura 2E).

Agua Mg/H₂ y su efecto en ratones modelo de MPTP aguda Para

experimentos adicionales, se utilizó agua H₂/Mg, que se hizo mediante un procedimiento mucho más fácil y seguro. El agua H₂/Mg contenía alrededor de 0,08 ppm de H₂. El agua H₂/Mg mostró un efecto protector similar al del agua burbujeada con H₂ sobre la pérdida de neuronas dopaminérgicas en ratones modelo de MPTP aguda. Sin administración MPTP, el agua H₂/Mg no tuvo efecto sobre el número de células TH positivas (19568; agua sin H₂/Mg, 19464; agua H₂/Mg, Figura 3A, 3C).

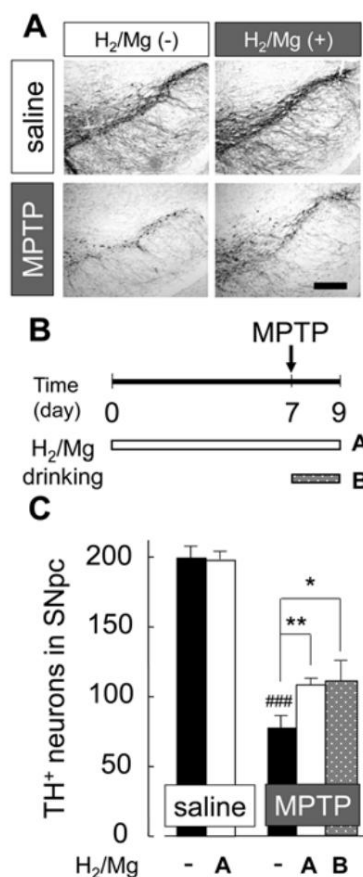


Figura 3. Beber agua H₂/Mg antes y después de la inyección aguda de MPTP redujo la pérdida de neuronas dopaminérgicas. (A) Neuronas dopaminérgicas TH positivas en SN. Los ratones se trataron con agua sin H₂ o agua con H₂/Mg antes y después de la inyección aguda de MPTP. Escala: 200 mm. (B) Horario para beber agua H₂ antes (i) y después (ii) de la inyección de MPTP. (C) Número promedio de neuronas TH positivas en ratones con inyección aguda de solución salina o MPTP. ANOVA unidireccional; ###P,0.001 en comparación con solución salina con agua sin H₂; *P,0.05, **P,0.01 en comparación con MPTP con agua sin H₂. Las barras de error representan la media de 6 SEM. doi:10.1371/journal.pone.0007247.g003

Para probar si beber agua con H₂/Mg era efectivo o no incluso después de sufrir estrés oxidativo, comparamos dos procedimientos diferentes (Figura 3B); uno administró agua H₂/Mg 7 días antes de la administración aguda de MPTP (Figura 3B; se muestra como i) y el otro administró agua H₂/Mg solo después de la administración de MPTP (Figura 3B; se muestra como ii). El resultado mostró que beber agua H₂/Mg redujo la pérdida de neuronas dopaminérgicas incluso después de la inyección de MPTP (Figura 3B, 3C; 16 % y 17 % de recuperación en el protocolo de bebida mostrado como A y B, respectivamente). Esto puede implicar que beber agua H₂ podría ser eficaz incluso después de la aparición de la enfermedad de Parkinson inducida por estrés oxidativo.

Dado que el agua H₂/Mg era alcalina (pH <8.8, Figura 1), probamos el efecto del agua alcalinizada (hasta pH 8.8) hecha agregando Mg(OH)₂ al agua pura. También probamos el efecto del Mg y otros elementos metálicos, Al y Zn que posiblemente podrían existir en el agua H₂/Mg, dejando el agua H₂/Mg durante 24 h (agua H₂/Mg desgasificada) para que todo el H₂ se hubiera ido. Ninguna de estas soluciones tuvo ningún efecto protector contra la neurotoxicidad derivada de MPTP (Figura 4A, 4B). Así, el efecto del agua H₂/Mg no se debía a elementos metálicos ni a su alcalinidad sino a su contenido de H₂.

MPTP se convierte en MPP⁺, que es indispensable para la neurotoxicidad derivada de MPTP. Por lo tanto, medimos la cantidad de MPP⁺ en el cuerpo estriado donde se incorporó mediante DAT. La cantidad de MPP⁺ en el cuerpo estriado no fue significativamente diferente en los animales que bebieron agua H₂ y agua sin H₂ (Figura 4C).

Por lo tanto, el efecto del agua H₂ contra la pérdida de dopaminérgicos

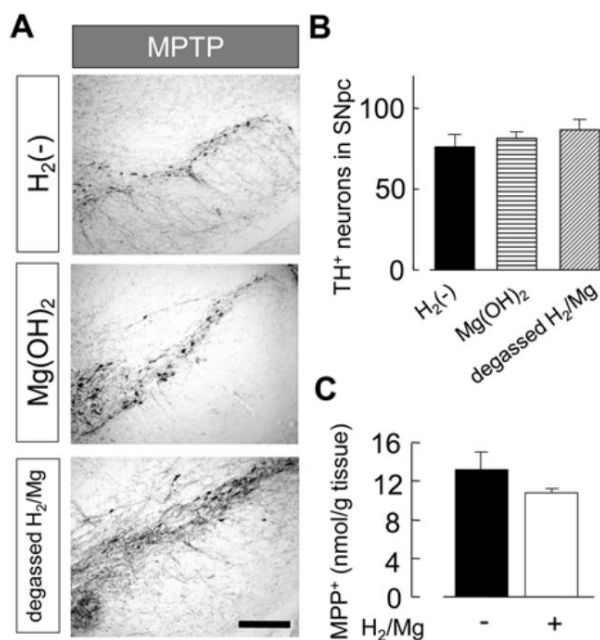


Figura 4. H₂, pero no el ion Mg y la alcalinidad, protegieron el daño neuronal de la neurotoxicidad aguda por MPTP. (A) Neuronas positivas para TH en SN en ratones que beben agua pura (agua sin H₂), agua con Mg(OH)₂ o agua con H₂/Mg desgasificada. Ni el agua Mg(OH)₂ ni el agua H₂/Mg desgasificada tuvieron un efecto significativo sobre la neurotoxicidad del MPTP. (B) Número medio de neuronas positivas para TH en SNpc en ratones que beben agua sin H₂, agua con Mg(OH)₂ y agua con H₂/Mg desgasificada. (C) La cantidad de MPP⁺ en el estriado en ratones que bebieron agua H₂/Mg (blanca) y agua pura (negra) no fue significativamente diferente. MPP⁺ se midió 3 h después de la última administración de MPTP, cuando la concentración de MPTP alcanzó el máximo. ANOVA de una vía. Las barras de error representan la media de 6 SEM. doi:10.1371/journal.pone.0007247.g004

neuronas en SNpc por MPTP no estaba relacionado con el metabolismo de MPTP.

El efecto del agua H₂ en el modelo de infusión crónica de MPTP A pesar de la falta de síntomas parkinsonianos en el modelo agudo de MPTP en roedores, probablemente debido al bajo nivel de MAO-B en los capilares del cerebro de los roedores [15], se pudo observar un deterioro del comportamiento en el modelo de infusión crónica de MPTP utilizando una minibomba osmótica para administrar el MPTP durante un período prolongado [16]. Esto podría proporcionar un mejor modelo para la enfermedad de Parkinson humana. En este experimento, los ratones recibieron agua H₂ o agua sin H₂ 7 días antes de la implantación de la bomba y el suministro de agua continuó hasta la extirpación del cerebro 28 días después (Figura 5A). La infusión crónica de MPTP indujo una pérdida de neurona dopaminérgica TH positiva en SNpc

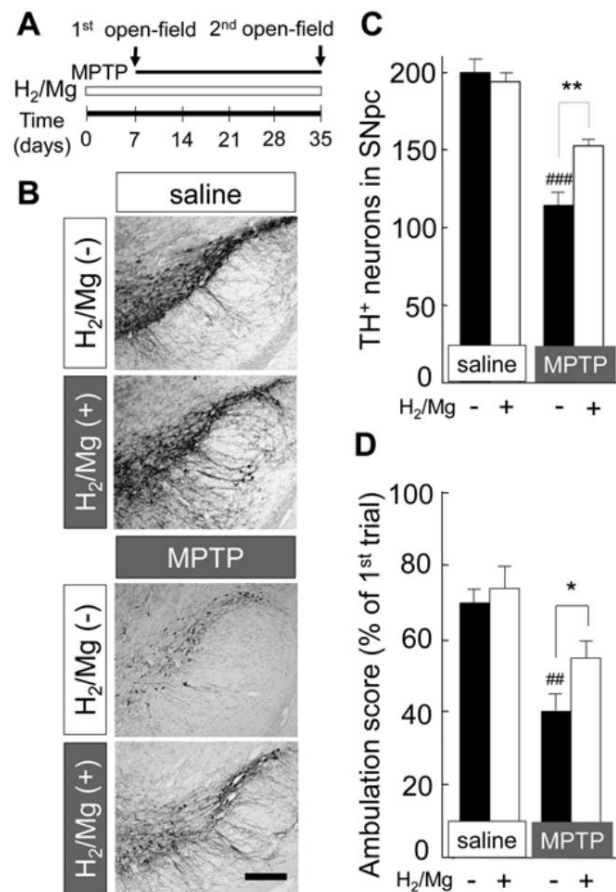


Figura 5. Beber agua H₂/Mg atenuó la neurotoxicidad y el fenotipo conductual inducido por la infusión crónica de MPTP. (A) Horario para la infusión continua de MPTP y observación del comportamiento.

Los ratones comenzaron a beber agua sin H₂ o agua H₂/Mg 1 semana antes de la infusión de la minibomba. La primera prueba de campo abierto se realizó en la mañana de la infusión de la bomba. La segunda prueba se realizó 28 días después de la infusión de la bomba. (B) Tinción con TH de ratones con infusión de solución salina que bebieron agua sin H₂ (I) o agua con H₂/Mg (II) y ratones con infusión de MPTP que bebieron agua sin H₂ (III) o agua con H₂/Mg (IV). (C) Número promedio de neuronas positivas para TH en ratones con infusión de solución salina o MPTP (n = 6). Se obtuvieron muestras de cerebro de seis secciones SN coronales de 20 mm.

(D) La supresión de la actividad de campo abierto por infusión crónica de MPTP se recuperó parcialmente bebiendo agua H₂/Mg. La puntuación de deambulación relativa en la segunda medición se expresó como porcentaje de la primera medición (n = 6 para cada grupo). ANOVA unidireccional; ###P,0.001 en comparación con solución salina con agua sin H₂; *P,0.05, **P,0.01 en comparación con MPTP con agua sin H₂. Las barras de error representan la media de 6 SEM. doi:10.1371/journal.pone.0007247.g005

(Figura 5B). En los ratones que bebieron agua H₂, la pérdida de células TH positivas (76 % del control: agua salina y sin H₂) fue menor que en los ratones que bebieron agua sin H₂ (56 % del control: agua salina y sin H₂) (Figura 5C). Para la prueba de comportamiento, se compararon las puntuaciones de deambulación en la prueba de campo abierto. Utilizando la prueba de campo abierto ligeramente modificada informada previamente [16], la puntuación de deambulación se expresó como porcentaje de la obtenida en la primera prueba. Beber agua H₂ no mostró ningún cambio significativo en la puntuación de deambulación en ratones con infusión de solución salina (6963 % con agua sin H₂ y 7366 % con agua H₂, respectivamente). La puntuación de deambulación en ratones con infusión crónica de MPTP con agua no H₂ fue del 4064 %, mientras que en ratones con agua H₂ fue del 5464 % (Figura 5D). También se examinaron otras pruebas de comportamiento, por ejemplo, la prueba rotarod y la prueba de suspensión de la cola, pero no se observaron efectos significativos después de la infusión crónica de MPTP (datos no mostrados).

El agua de hidrógeno redujo la producción de 4-HNE en la neurona dopaminérgica del SN.

Además, se informa que la 4-HNE media en la inducción de la apoptosis neuronal en presencia de estrés oxidativo [18]. En el modelo MPTP agudo, el nivel de proteína de 4-HNE en el mesencéfalo aumenta [12,19]. En ratones inyectados con solución salina, la fluorescencia inmunorreactiva de 4-HNE en la neurona positiva para TH fue mínima (Figura 6A, 6B). Por el contrario, en ratones tratados con MPTP, la fluorescencia de 4-HNE aumentó significativamente 24 h después de la última inyección de MPTP.

En ratones que bebieron agua hidrogenada, el nivel de referencia de la fluorescencia de 4-HNE no cambió, pero el sorprendente aumento de la fluorescencia después de la administración de MPTP prácticamente se anuló, a un nivel que no estaba significativamente por encima de la referencia (Figura 6B).

El agua de hidrógeno no logró reducir la producción de superóxido intracelular en la neurona dopaminérgica SN

El superóxido intracelular (O₂N₂) se detectó mediante la administración del indicador O₂N₂, dihidroetidio (DHE) [20]. Cuando el DHE es oxidado por O₂N₂, se une al ADN y se observa una fluorescencia roja brillante dentro del cuerpo celular.

La intensidad de DHE en células TH-positivas aumentó significativamente en los ratones tratados con MPTP agudo en comparación con los ratones tratados con solución salina (Figura 6A, 6B). Los ratones que bebieron agua con hidrógeno parecían mostrar una ligera disminución de la intensidad fluorescente de DHE en comparación con los ratones con agua sin hidrógeno con inyección de MPTP, pero esto no fue estadísticamente significativo (p = 0,21). En cuanto a la microglía, que es una de las fuentes de liberación de superóxido en SN, la microglía no mostró su activación 24 h, sino 48 h después del tratamiento con MPTP. En ratones que bebieron agua H₂, el cambio morfológico de la microglía también se observó 48 h, pero no 24 h después de la administración de MPTP (Figura S1).

Acumulación de 8-oxoguanina celular en cuerpo estriado

La pérdida de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP se asocia con la acumulación de 8-oxoguanina (8-oxoG) en la vía nigroestriatal [5]. 8-oxoG es la principal forma de guanina oxidada por NOH y se acumula tanto en el ADN mitocondrial como en el nuclear [21]. Por lo tanto, 8-oxoG se usa ampliamente como un índice de estrés oxidativo del ADN. La distinción entre la acumulación de 8-oxoG en el ADN mitocondrial y nuclear puede realizarse mediante técnicas inmunohistoquímicas [5,22]. En nuestro estudio, investigamos la acumulación de 8-oxoG mitocondrial en el cuerpo estriado, donde terminan las terminales nerviosas dopaminérgicas. El 8-oxoG mitocondrial mostró una acumulación significativa en el cuerpo estriado 24 h después de la administración aguda de MPTP.

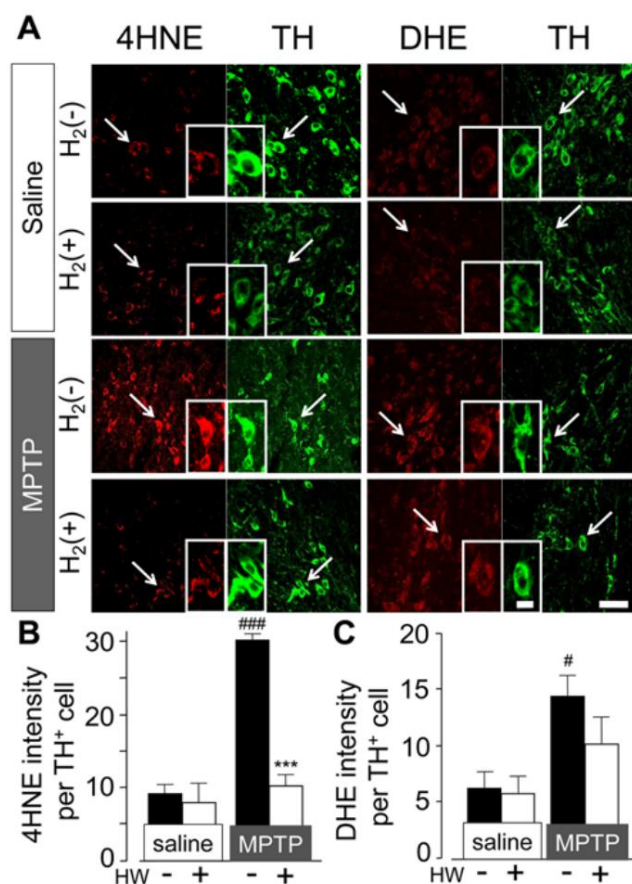


Figura 6. El agua H₂ redujo la fluorescencia de 4-HNE, pero no la de DHE en SN después de la administración de MPTP. (A) Imágenes fluorescentes de 4-HNE, DHE y TH en SN (n = 3,4). Ratones tratados con agua sin H₂ o agua H₂/Mg con inyección de solución salina o MPTP. Todas las muestras se adquirieron 24 h después de la administración de solución salina o MPTP. Escala: 50 mm. (B, C) Cuantificación de la intensidad de 4-HNE (B) y DHE (C) en células TH positivas en SN. ANOVA de una vía; #P,0,05, ###P,0,001 en comparación con solución salina con agua sin H₂; ***P,0,001 en comparación con MPTP con agua sin H₂. Las barras de error representan la media de 6 SEM. doi:10.1371/journal.pone.0007247.g006

El agua H₂ redujo esta acumulación a un nivel no significativamente diferente del control (Figura 7A, 7B). A las 24 h después de la administración aguda de MPTP, la microglía en el cuerpo estriado se activó en ratones que bebieron agua H₂ y no H₂ (datos no mostrados), y de manera similar en el SN 48 h después de la administración de MPTP (Figura S1).

Discusión

Este estudio muestra que beber agua que contiene H₂ (agua H₂) atenuó los efectos neurotóxicos agudos de MPTP en las neuronas dopaminérgicas. El agua H₂ también fue eficaz en el deterioro del comportamiento producido por la administración crónica de MPTP, el principal síntoma de la enfermedad de Parkinson (EP). Encontramos que la baja concentración de H₂ en el agua potable, muy por debajo de las concentraciones de saturación, mostró efectos neuroprotectores contra la pérdida inducida por MPTP de neuronas dopaminérgicas y fibras neuronales en la vía nigro-estriatal, y que esto podría verse incluso después del inicio del insulto neurotóxico. El agua H₂ también redujo la cantidad de productos oxidativos derivados de ROS, como 4-HNE y 8-oxoG, que serían las causas principales de la apoptosis neuronal en las neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, nuestro estudio puede allanar el camino hacia una nueva estrategia neuroprotectora utilizando agua H₂ en pacientes con EP.

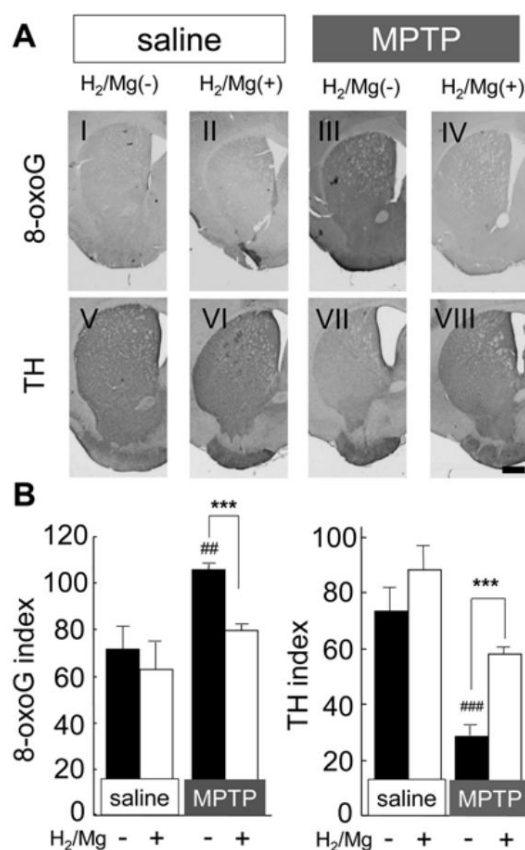


Figura 7. El agua H₂ disminuyó la acumulación de 8-oxoG en el cuerpo estriado después de la administración de MPTP. (A) La administración aguda de MPTP aumentó significativamente la acumulación de 8-oxoG mitocondrial (I y III) e indujo la pérdida de neuronas y fibras TH positivas (V y VII). Sin embargo, en ratones que bebieron agua H₂/Mg, no se observó una acumulación significativa de 8-oxoG (II y VI) ni tinción positiva para TH (VI y VIII). Los cerebros se extirparon 24 h después de la administración de solución salina o MPTP. Escala: 500 mm. (B) Índice inmunoreactivo para 8-oxoG y TH (n = 4 cada uno). ANOVA unidireccional; ##P,0,01 y ###P,0,001 en comparación con solución salina con agua sin H₂; ***P,0,001, en comparación con MPTP con agua sin H₂. Las barras de error representan la media de 6 SEM. doi:10.1371/journal.pone.0007247.g007

La EP es un trastorno degenerativo progresivo del sistema nervioso, lo que significa que se vuelve cada vez más incapacitante con el tiempo. Es una condición crónica, de por vida. Se han especulado varias causas: las neuronas dopaminérgicas pueden morir o dañarse por infección, trauma o toxinas que se encuentran en el medio ambiente, como MPTP.

También puede haber algunos vínculos genéticos. Las deficiencias por todas estas causas generalmente están relacionadas con diversos grados de estrés oxidativo [23]. El estrés oxidativo contribuye a la cascada que conduce a la degeneración de las células dopaminérgicas en la EP. Los estudios revelaron que varios biomarcadores de daño oxidativo están elevados en el GC del cerebro con EP [9]. Además, las neuronas dopaminérgicas pueden ser un entorno particularmente fértil para la generación de ROS, ya que el metabolismo de la dopamina produce peróxido de hidrógeno y radicales superóxido, y la autooxidación de la dopamina produce dopamina-quinona, una molécula que daña las proteínas al reaccionar con los residuos de cisteína [9,24].

Teniendo en cuenta estos informes, reducir el estrés oxidativo o el daño oxidativo se convertiría en una forma potencial de prevenir la EP. El H₂ actúa como un antioxidante terapéutico al reducir selectivamente los radicales de oxígeno citotóxicos [1–4,14,25,26], ya sea por inhalación o consumo. Aunque la inhalación de H₂ puede actuar

más rápidamente, no es práctico en la vida diaria o adecuado para el consumo continuo. El agua H₂ es claramente más conveniente y se adapta bien a un estilo de vida normal. La forma más conveniente de agua H₂ es agua H₂/Mg. En nuestros experimentos, ni la alcalinidad ni el magnesio tuvieron ningún efecto, pero las pequeñas cantidades de H₂ disueltas resultaron tener importantes efectos neuroprotectores y antioxidantes.

En cuanto a la concentración de H₂, se reportó que el H₂ disuelto en sangre arterial se incrementó por la inhalación de H₂ en proporción a la concentración inhalada, de 0 a 4%, junto con O₂ y N₂O; la cantidad de H₂ disuelta en la sangre venosa fue menor que la de la sangre arterial, lo que sugiere que el H₂ se había incorporado a los tejidos [1]. Recientemente también se informó que la concentración sanguínea de H₂ que se incorporó desde el estómago utilizando agua con H₂ saturado fue de 5 mM [3]. Intentamos medir la concentración de H₂ en estriado de rata con análisis de voltamperometría cíclica utilizando un electrodo de H₂ (electrodo de platino recubierto de teflón para el estudio del flujo sanguíneo cerebral, de 200 mm de diámetro) [27] insertado a través de una cánula-guía previamente montada [28] (Ver Materiales y Métodos S2). Pudimos detectar el cambio de H₂ en el cuerpo estriado durante la inhalación de H₂ (Figura S2). Aumentó inmediatamente cuando las ratas comenzaron a inhalar el gas H₂ y alcanzó una meseta en 10 minutos (0,22 ppm; 110 mM), pero disminuyó poco después de detener la inhalación (t_{1/2}= 343 s; n = 3). Sin embargo, no pudimos detectar ningún cambio en la concentración de H₂ al instilar agua saturada con H₂ en el estómago de ratas anestesiadas o en ratas que se movían libremente bebiendo agua con H₂. Si hay una disminución de 160 veces en la concentración de H₂ entre el estómago y la sangre [3], habría una disminución aún mayor entre la concentración de H₂ en el agua potable (máximo 1,5 ppm) y la del tejido estriado. Esto sugiere que la concentración de H₂ tisular estaría por debajo del nivel de detección.

Por lo tanto, aunque se esperaba que el H₂ tisular aumentara después de beber agua con H₂, actualmente existe un problema técnico para detectar niveles tan bajos.

En el modelo de EP, las ROS pueden liberarse tanto del citosol como de las mitocondrias de la neurona DA [29–32]. La administración de MPTP provoca su disfunción a través de la inhibición del complejo I, que está asociado con la cadena de transporte de electrones [11]. Estudios posteriores han identificado anomalías en la actividad del complejo I en la EP [9,33]. La disfunción mitocondrial causa una producción masiva de ROS, especialmente O₂N 2. En la terminal nerviosa de la neurona dopaminérgica en el cuerpo estriado, donde hay abundantes mitocondrias, se previó una mayor producción de O₂N 2 [9]. Además, el O₂N 2 se transforma en NOH mediante varios pasos, incluida la reacción de Fenton, que es catalizada por hierro ferroso (Fe²⁺). El Fe²⁺ puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (producido durante la desaminación oxidativa de la dopamina) para generar NOH que puede dañar las proteínas, los ácidos nucleicos y los fosfolípidos de la membrana, lo que lleva a la degeneración celular [34–36]. Mostramos que se produjo un aumento significativo en los marcadores característicos del daño oxidativo en la vía nigroestriatal, como 4-HNE, 8-oxoG mitocondrial y DHE, 24 h después de la administración de MPTP. 4-HNE y 8-oxoG son marcadores bien conocidos de agresión oxidativa causada principalmente por NOH. Se observó 4-HNE en la superficie de la membrana de la neurona dopaminérgica positiva para TH en SN, y se acumuló 8-oxoG mitocondrial en el cuerpo estriado durante el mismo período (24 h después de la administración de MPTP). Se ha informado previamente que el 8-oxoG mitocondrial, la forma oxidativa de NOH de la guanina y un marcador de daño en el ADN, se acumula en el cuerpo estriado de los ratones inyectados con MPTP [5]. Sin embargo, el agua hidrogenada disminuyó significativamente la cantidad de 4-HNE en el SN y mitocondrial.

8-oxoG en el cuerpo estriado. Esto indica que el hidrógeno actuó reduciendo la producción primaria de NOH en la vía nigroestriatal.

Se detecta una señal de fluorescencia de DHE cuando DHE y O₂N reaccionan y el DHE oxidado se incorpora al ADN. Por lo tanto, DHE se usa ampliamente para obtener imágenes de O₂N 2 intracelular tanto *in vitro* como *in vivo* [37–39]. Durante la neurotoxicidad de MPTP, se libera O₂N 2 no solo de las mitocondrias neuronales, sino también por autooxidación de dopamina en las neuronas dopaminérgicas [40]. Además, la NADPH oxidasa en la microglía activada es una fuente de O₂N 2 en la vía nigroestriatal [41]. Sin embargo, en nuestros experimentos, observamos la producción de O₂N 2 a las 24 h, antes de la activación microglial. Aunque la microglía juega un papel clave en la liberación de O₂N 2, la actividad de NADPH microglial aumenta junto con la activación microglial y el pico de actividad de NADPH solo se observa 48 h después de la administración de MPTP [42]. En nuestro caso, la microglía se activó luego de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, no antes, como se muestra en la Figura S1. Aunque algunas microglías en el SN se activaron en 24 h, podemos concluir que las señales de DHE que observamos en 24 h después de la inyección de MPTP reflejaron principalmente la producción neuronal de O₂N 2 en SN.

En un estudio anterior, el hidrógeno redujo el NOH pero no otros tipos de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno [1]. Sin embargo, *in vivo*, se sabe poco si el hidrógeno muestra una reducción selectiva de ROS [4]. En nuestro experimento, la intensidad de DHE no se redujo significativamente por el agua de hidrógeno en ratones tratados con MPTP, lo que indica que el agua de hidrógeno mostró una reducción menor o nula de O₂N 2. Esto concuerda con el informe anterior de que el hidrógeno mostró una reducción selectiva de ROS [1]. Por otro lado, otro estudio ha demostrado que el agua hidrogenada puede reducir la cantidad de O₂N 2 *in vivo* [4]. Estos resultados opuestos pueden relacionarse con las diferentes concentraciones de hidrógeno en el agua potable. Nuestra agua de hidrógeno contenía una cantidad mucho menor de hidrógeno que el agua de hidrógeno saturada, lo que puede no ser suficiente para reducir el O₂N 2.

Proporcionamos un modelo de administración crónica de MPTP utilizando una minibomba osmótica que modifica el método anterior. Sin embargo, el número de neuronas positivas para TH en ratones modelo MPTP crónica fue mayor que en ratones modelo MPTP aguda. El modelo de infusión continua de MPTP causó menos toxicidad aguda porque las concentraciones máximas de MPP⁺ en el cuerpo estriado fueron más bajas [16]. Varios informes indicaron que la pérdida de los procesos dendríticos en el estriado y los cuerpos celulares de las neuronas TH-positivas nigrales no eran permanentes y se observó una recuperación de la inmunorreactividad TH estriatal y nigral después de que MPTP se eliminara sistémicamente [42–44]. Dichos aumentos en la inmunorreactividad de TH pueden reflejar el brote de fibras residuales [44] o la aparición de novo de neuronas TH positivas en cuerpo estriado con depleción de dopamina [45–47], pero es más probable que representen un mecanismo compensatorio para niveles de dopamina crónicamente reducidos como se sugiere en estudios post-mortem de cerebros con EP [48]. Teniendo en cuenta estos informes, podemos concluir que el número de neuronas positivas para TH en el modelo MPTP crónico no disminuye tanto como en el modelo MPTP agudo porque la recuperación crónica y el daño de la fibra TH ocurrieron simultáneamente en la vía nigroestriatal. Sin embargo, la administración crónica indujo un deterioro del comportamiento. Este deterioro puede deberse a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas, es decir, la pérdida de dopamina y norepinefrina, pero no de serotonina, de las áreas objetivo de las respectivas neuronas. Y lo que es más, la neurotoxicidad crónica indujo la formación de cuerpos de inclusión neuronal y la degeneración de las neuronas catecolaminérgicas, similares a los efectos de la administración crónica de rotenona, que también es un inhibidor del complejo mitocondrial I [49–51]. Por lo tanto, la inhibición mitocondrial continua puede afectar el sistema de proteasoma de ubiquitina, que a su vez recrea un estado de enfermedad que imita la EP humana mejor que la inhibición mitocondrial aguda.

Las lesiones dopaminérgicas inducidas por MPTP se utilizan comúnmente para modelar la EP y, aunque MPTP imita de manera eficaz la dopamina



neuropatología nerviosa de la enfermedad de Parkinson en ratones, no produce déficits motores similares a la enfermedad de Parkinson [52]. Aunque la administración continua de MPTP con una minibomba osmótica imita muchas características de la enfermedad humana [16], no hubo efectos significativos en el deterioro del comportamiento, excepto que solo la prueba de campo abierto mostró un cambio significativo, pero no en otras pruebas como la prueba rotarod, la prueba de suspensión de la cola y la prueba del anillo (datos no mostrados). En ratones modelo de EP aguda, se informó la gravedad relacionada con la edad de la neurodegeneración dopaminérgica y la disfunción motora a la neurotoxicidad de MPTP. Aunque los ratones jóvenes (10 semanas) no mostraron mortalidad en ninguno de los tratamientos con MPTP, los ratones mayores (14 a 15 meses) mostraron mortalidad con solo dos inyecciones de MPTP durante el período experimental [53]. Aunque los efectos del agua H2 en la respuesta conductual no se probaron en ratones mayores en el estudio actual, nuestros resultados plantearon la posibilidad de que el agua H2 pueda reducir el trastorno del movimiento en pacientes con EP.

H2 también sería útil para otras enfermedades causadas por el estrés oxidativo. Ya se ha encontrado que el H2 es efectivo no solo para la lesión isquémica sino también para el daño hepático y la enfermedad cognitiva [1–3,23]. Por otro lado, el 8-oxoG se acumula tanto en el genoma nuclear como en el mitocondrial durante el envejecimiento [54], y se informó un aumento espectacular en la acumulación de 8-oxoG en pacientes con tumores [55] y otros tipos de enfermedades neurodegenerativas como la EP [56], la enfermedad de Alzheimer [57] y la esclerosis lateral amiotrófica [58]. Varios experimentos con ratones knockout genéticos revelaron la correlación entre la acumulación de 8-oxoG y el trastorno funcional de las enzimas reparadoras como MTH1 [59], MUTHYH [60] y OGG1 [61], lo que sugiere que H2 también puede suprimir la tumorigénesis.

El propio gas H2 tiene riesgo de inflamabilidad y explosión. Sin embargo, beber agua H2 sería mucho más seguro y fácil, siendo más práctico. Además, la concentración requerida de H2 en el agua potable no es necesariamente alta. Nuestro estudio también reveló que beber agua H2 incluso después de la administración aguda de MPTP también fue efectivo. Si bien no existe una forma conocida de prevenir la EP, los estudios actuales sugieren firmemente que beber agua H2 podría reducir el riesgo de estrés oxidativo relacionado con el estilo de vida y enfermedades neurodegenerativas relacionadas.

Materiales y métodos

Agua que contiene hidrógeno y su contenido de H2

El agua que contiene hidrógeno (agua H2) se hizo de dos maneras. Una forma era disolviendo gas H2, producido por electrólisis del agua (hecho a mano por Panasonic Electric Works Co., Ltd., Japón), directamente en agua pura. Otra forma fue utilizar la reacción electroquímica entre el magnesio y el agua (H2O): $\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}^{2+} + 2\text{OH}^- + \text{H}_2$. Una barra de magnesio compuesta por 90 % Mg, 9 % aluminio y 1 % zinc (6 mm de diámetro, 10 cm de longitud, Nakagawa Metal, Japón) se limpió superficialmente con ácido acético 0,1 N y se sumergió en agua pura durante aproximadamente 1 minuto. El contenido máximo de H2 con este método fue de aproximadamente 0,08 ppm, medido con un electrodo de hidrógeno (DH-35A, TOA DKK Co. Ltd., Japón).

El agua H2 electrolizada también se ajustó para tener 0,08 ppm de H2 a menos que se indique lo contrario.

pH del agua H2 y solución de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ El pH del agua

H2 producida por la reacción química con Mg fue de aproximadamente 8,8 debido a la formación de $\text{Mg}(\text{OH})_2$, mientras que el pH del agua pura fue de 5,9. Para investigar el efecto de la solución alcalina (pH 8,8), se añadió $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (<80 mM) a agua pura.

Tratamiento de ratones con agua H2 Los

protocolos con animales fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Kyushu. Macho C57BL/6J (CLEA Japón

Inc., Japón) ratones de 8,12 semanas de edad se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h. Se preparó agua H2 fresca cada día y se administraron 40 ml en botellas de vidrio con tapas de goma herméticas por cada 4 ratones durante 8 h (4 a 12 h). A menos que se indique lo contrario, los ratones se trataron con agua H2 o no H2 durante 7 días antes de la administración de MPTP. Para el modelo crónico de MPTP, el tratamiento con agua H2 o no H2 continuó después de la administración de MPTP.

Inyección aguda e infusión continua de MPTP

Para la inyección aguda de MPTP, se administró MPTP-HCl (20 mg/kg de base libre, SIGMA, EE. UU.) a los ratones por vía intraperitoneal (ip) tres veces (con 2 h de diferencia) y se extrajeron los cerebros bajo anestesia 48 h después de la última inyección de MPTP. MPTP se disolvió en NaCl al 0,9%. Para la infusión continua de MPTP se trasplantó por vía subcutánea una minibomba osmótica (ALZET modelo 2004, EE. UU.) que liberaba solución salina o solución de MPTP a razón de 45 mg/kg al día. Después de la implantación, se suturó la incisión y se desinfectó con etanol al 70% todos los días. Veintiocho días después del inicio de las infusiones de MPTP, se extrajeron los cerebros bajo anestesia. Verificamos que no se retirara ninguna solución en el

bomba después de que se extrajo el cerebro.

Inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa (TH)

Las neuronas TH-positivas se tiñeron como se describió anteriormente [5]. Secciones de cerebro (20 y 40 mm de espesor en SN y cuerpo estriado, respectivamente) se incubaron en solución de bloqueo (Block Ace, Dainippon Pharmaceutical, Japón) durante 30 min a temperatura ambiente, y luego se incubaron con anticuerpo primario (anticuerpo anti-TH de conejo; 1:500, AB152, Chemicon, EE. UU.) en Block Ace al 10 % en PBS, a 4 °C durante la noche. Las secciones enjuagadas se sumergieron en una solución de H_2O_2 al 3 % en metanol/PBS (1:1) durante 30 min a temperatura ambiente y luego se procesaron con el kit Vectastain ABC (Vector, EE. UU.) con anticuerpo secundario (IgG anti-conejo biotinilado, 1:200, Vector, EE. UU.). El producto de reacción de la peroxidasa se detectó utilizando tetrahidrocloreuro de 3939-diaminobencidina (DAB, Vector, EE. UU.). A continuación, todas las secciones se lavaron en PBS, se cubrieron con un cubreobjetos y se analizaron con AxioSkop2 equipado con una cámara CCD, AxioCam (Carl Zeiss, Alemania). El número de neuronas de dopamina en el SNpc se estimó contando todas las neuronas TH positivas de dos hemisferios de seis secciones coronales (20 mm de espesor) por animal que se distribuyeron cada 100 mm a lo largo del eje rostral-caudal del SN (23,08 a 23,64 mm caudal a bregma) [62].

Las células microgliales se tiñeron como se describe en Materiales y Métodos S1 [Referencias S1].

Análisis estereológico de la neurona dopaminérgica nigral

Realizamos un análisis estereológico utilizando un método ligeramente modificado como se describió anteriormente [63–65]. Se obtuvieron secciones coronales (30 mm de espesor) a través de SNpc (22,70 mm a 23,80 mm con respecto a bregma) en criostato MICROM. Las secciones flotantes se incubaron con Block Ace (Dainippon Pharmaceuticals, Japón) durante 30 minutos, seguido de la incubación del anticuerpo primario (anticuerpo anti-TH, Chemicon, EE. UU., 1:3000 en Block Ace al 10 %) durante 2 días a 4 °C. Después de sumergir las secciones enjuagadas en una solución de H_2O_2 al 3 % en metanol/PBS (1:1) durante 10 min a temperatura ambiente, el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo de cabra biotinilado, 1:400, Vector, EE. UU.) se incubó durante 2 h y luego se procesó con el kit Vectastain ABC (Vector, EE. UU.). El producto de reacción de la peroxidasa se detectó utilizando 3939-diaminobencidinatatetrahidrocloreuro (DAB, Vector, EE. UU.). Todas las secciones se cubrieron con Glycergel Mounting Medium (Dako, Dinamarca).

Para los recuentos estereológicos, se utilizó el software de análisis Stereo Investigator (Stereo Investigator 8, MicroBrightField Inc., EE. UU.) para

realizar recuentos estereológicos imparciales de cuerpos celulares inmunorreactivos a TH en el SNpc utilizando el método de fraccionamiento óptico [66]. El límite de SNpc se delineó con un aumento del objetivo de 10x. Se obtuvieron cada tres secciones (ocho secciones por cerebro) y se contaron las células con un objetivo de 40x en un Nikon ECLIPSE 80i utilizando una cuadrícula de 70670 mm en una cuadrícula de conteo (756100612 mm) con zonas de protección superior e inferior de 2 mm. El número absoluto de neuronas TH-positivas se calculó directamente y el coeficiente de error de Gundersen en todas las muestras fue <0,07.

Marcaje de superóxido intracelular in vivo Los niveles de

superóxido intracelular se detectaron mediante la cuantificación de la fluorescencia del producto de oxidación de dihidroetidio (DHE, Molecular Probes, EE. UU.). La oxidación de DHE por superóxido convierte DHE, que muestra una débil fluorescencia azul, en un derivado de etidio (oxi-Et) que muestra un pico de fluorescencia en el espectro de la rodamina (excitación 480 nm, emisión 567–586 nm)

[20]. DHE, que es permeable a la célula, ingresa a la célula y, después de la oxidación, se une al ADN con un pequeño cambio en su espectro de emisión a 567 nm. DHE tiene una mayor especificidad para el superóxido en comparación con otros tintes que son sondas de especies de oxígeno reactivo más generales. La solución de DHE (200 ml; 1 mg/ml en PBS) se administró por vía intravenosa 5 h antes de extirpar el cerebro.

Se cortaron los cerebros en espesores de 40 µm usando un criostato y se obtuvieron secciones flotantes de la parte de SN, como se mencionó anteriormente en inmunohistoquímica de TH.

Para la tinción inmunofluorescente de TH, las secciones se incubaron con Block Ace durante 30 min a temperatura ambiente. Las secciones de cerebro se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpo primario, anticuerpo anti-TH de conejo (chemicon, 1:1000) y se incubaron durante 4 h con IgG anti-conejo de cabra Alexa fluor 488 (Molecular Probes, 1:500, EE. UU.) a temperatura ambiente. Cada tratamiento fue seguido por tres lavados durante 5 min con PBS. Las secciones se montaron en el medio de montaje acuoso permafluor (Thermo, Japón) y se analizaron con un microscopio de barrido láser confocal (LSM510META, Carl Zeiss, Alemania).

Marcaje fluorescente de 4-hidroxinonenal en SNpc

Para la detección de peróxido de lípido celular, tiñemos 4-hidroxino nenal (4-HNE). Brevemente, se obtuvieron secciones flotantes de la parte de SN y se incubaron con el anticuerpo primario durante la noche después de la incubación con Block Ace. Luego, las secciones se incubaron con IgG anti-ratón biotinilada (Jackson, EE. UU., 1:400), seguido de estreptavidina Alexa 594 (Molecular Probes, EE. UU., 1:1000). Después de teñir con 4-HNE, se tiñó TH como se describe anteriormente.

Análisis cuantitativo de la señal fluorescente de DHE y 4-HNE Todas las muestras

se analizaron con un microscopio de barrido láser confocal (LSM510META, Carl Zeiss, Alemania). Para cada corte, se obtuvieron y proyectaron 10 series de imágenes z-stack correspondientes a 2 mm en el eje z utilizando el navegador de imágenes LSM (Carl Zeiss, Alemania). Para la cuantificación de la intensidad fluorescente de DHE y 4-HNE, todas las imágenes se convirtieron a escala de grises y se midió el promedio de intensidad de píxel de cada celda usando Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems). Se observaron más de 60 células fusionadas con inmunofluorescencia de TH por animal y se calculó el valor medio de intensidad/célula/animal en cada grupo.

Inmunohistoquímica de 8-oxoguanina en cuerpo estriado

El método de tinción de 8-oxoG en el ADN mitocondrial se describió anteriormente [5, 22]. Para eliminar el ARN celular, las secciones se incubaron en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), 15 mM

NaCl que contiene RNasa libre de DNasa (5 mg/ml de RNasa A incubada con calor, Sigma, EE. UU.) durante 60 min a 37 °C. En esta condición, el ADN nuclear no se desnaturaliza en absoluto, por lo tanto, el anticuerpo anti-8-oxoG no puede acceder a los residuos 8-oxoG enterrados en la cromatina intacta en los núcleos, mientras que el anticuerpo accede fácilmente a los residuos 8-oxoG en el ADN mitocondrial que no tiene una estructura de cromatina compacta. Para detectar 8-oxoG en el ADN nuclear, la sección debe someterse a un pretratamiento con HCl 2 N durante 1 h a temperatura ambiente, lo que permite una desnaturalización eficiente de la cromatina nuclear pero una degradación extensa del ADN mitocondrial [22]. Las secciones de flotación libre pretratadas se incubaron en Block Ace, durante 30 min a temperatura ambiente, y luego se incubaron con anticuerpo primario (N45.1 mAb 1:100, Instituto Japonés para el Control del Envejecimiento, Japón) en Block Ace al 10 %, a 4 °C durante la noche. Las secciones enjuagadas se sumergieron en una solución de H₂O₂ al 3 % en metanol/PBS (1:1) durante 15 min a temperatura ambiente, y luego se procesaron con el kit Vectastain ABC con un anticuerpo secundario biotinilado y el producto de reacción de la peroxidasa se detectó con DAB. Las imágenes digitales se adquirieron usando Axioskop2 plus equipado con una cámara CCD, AxioCam. Todas las secciones de cada animal de experimentación y grupo a comparar se procesaron en paralelo.

Análisis morfométrico cuantitativo de 8-oxoG

Todas las imágenes digitales adquiridas se procesaron de manera uniforme, como se describió anteriormente [5], en un umbral en un modo de escala de grises para restar cualquier fondo correspondiente al área sin tejido, y la densidad óptica (DO) de cada área inmunorreactiva se calculó con Adobe Photoshop versión 7.0 (Adobe Systems). De cada animal individual, se midieron cinco secciones representativas y se calculó la DO media como índice de inmunorreactividad para cada animal. Todos los análisis cuantitativos fueron realizados por un individuo que desconocía los tratamientos experimentales.

Prueba de campo abierto para ratones modelo de infusión continua de MPTP

Antes y 28 días después de implantar las bombas osmóticas, se realizaron pruebas de campo abierto entre las 9 y las 12 de la mañana. Se utilizó un campo abierto redondo de 60 cm de diámetro base y 90 cm de diámetro superior, rodeado por un muro de 50 cm de alto. Durante la observación, se colocó una lámpara de 100 W a 80 cm por encima del campo. Cada ratón se colocó en el centro del campo y se registraron los movimientos. Cada ratón se probó durante 3 minutos y se contó el número de veces que cruzaron una línea dibujada en el campo (modificado del método descrito anteriormente [67]).

Medición MPP+

Se utilizó detección HPLC-UV (longitud de onda, 295 nm) para medir los niveles de 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+, SIGMA, EE. UU.) en el estriado utilizando el método descrito anteriormente [68,69]. Los cerebros de los ratones se sometieron a medición 1,5, 3, 6 h después de que se tratara con MPTP (n = 4). La solución estándar de MPP+ (500 nM) se preparó por dilución de la solución madre de MPP+ (1 mM en glicerol al 20 %, MeOH al 2,5 % en agua pura, pH 4,0 con H₃PO₄) .

Análisis estadístico

Todos los datos representan la media ± error estándar de las medias (SEM). Los datos se compararon con ANOVA unidireccional, seguido de la prueba de Bonferroni. Los valores de p < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

información de soporte

Figura S1 Inmunohistoquímica de microglía en sustancia negra.

Los ratones que bebieron agua sin H₂ (H₂(2)) o agua H₂ (H₂(+)) se trataron con solución salina o MPTP. Los cerebros se obtuvieron 24 h o 48 h después de la última

inyección de solución salina o MPTP. Las células microgliales se inmunotearon con anticuerpo anti-Iba1 (1:1000, WAKO). Escala: 50 mm.
Encontrado en: doi:10.1371/journal.pone.0007247.s001 (3.97 MB TIF)

Figura S2 Curva de concentración representativa de H2 en el cuerpo estriado.
A las ratas anestesiadas se les insertó un electrodo de H2 en el cuerpo estriado derecho y se registraron las corrientes por voltamperometría. Las ratas comenzaron a inhalar gas H2 a los 200 s después del inicio del registro y se detuvieron a los 800 s.
Encontrado en: doi:10.1371/journal.pone.0007247.s002 (0.39 MB TIF)

Materiales y Métodos S1
Encontrado en: doi:10.1371/journal.pone.0007247.s003 (0.02 MB DOC)

Materiales y Métodos S2
Encontrado en: doi:10.1371/journal.pone.0007247.s004 (0.02 MB DOC)

Referencias S1
Encontrado en: doi:10.1371/journal.pone.0007247.s005 (0.02 MB DOC)

Referencias

1. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, et al. (2007) El hidrógeno actúa como un antioxidante terapéutico al reducir selectivamente los radicales de oxígeno citotóxicos. *Nat Med* 13: 688–694.

2. Cai J, Kang Z, Liu WW, Luo X, Qiang S, et al. (2008) La terapia con hidrógeno reduce la apoptosis en el modelo de rata con hipoxia-isquemia neonatal. *Neurosci Lett* 441: 167–172.

3. Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S (2009) El consumo de hidrógeno molecular previene las deficiencias inducidas por el estrés en las tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo durante la restricción física crónica en ratones. *Neuropsychopharmacología* 34: 501–8.

4. Sato Y, Kajiyama S, Amano A, Kondo Y, Sasaki T, et al. (2008) El agua pura rica en hidrógeno previene la formación de superóxido en cortes de cerebro de ratones knockout SMP30/GNL sin vitamina C. *Biochem Biophys Res Commun* 375: 346–50.

5. Yamaguchi H, Kajitani K, Dan Y, Furuichi M, Ohno M, et al. (2006) MTH1, un nucleósido de purina trifosfatasa oxidado, protege las neuronas de dopamina del daño oxidativo en los ácidos nucleicos causado por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. La muerte celular difiere 13: 551–563.

6. Thomas B, Beal MF (2007) Enfermedad de Parkinson. *Genética Hum Mol* 16: R183–194.

7. Schapira AH (2008) Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Enfermedad de Parkinson. *Lancet Neurol* 7: 97–109.

8. Olanow CW, Tatton WG (1999) Etiología y patogénesis del Parkinson enfermedad. *Annu Rev Neurosci* 22: 123–144.

9. Dauer W, Przedborski S (2003) Enfermedad de Parkinson: mecanismos y modelos. *Neurona* 39: 889–909.

10. Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH (1985) Neurotoxina inductora de parkinsonismo, N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina: la captación del metabolito N-metil-4-fenilpiridina por las neuronas dopaminérgicas explica la toxicidad selectiva. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2173–2177.

11. Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE (1987) MPTP, MPP+ y Función mitocondrial. *Ciencias de la vida* 40: 721–729.

12. Liang LP, Huang J, Fulton R, Day BJ, Patel M (2007) Una metaloporfirina catalítica activa por vía oral protege contra la neurotoxicidad de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina in vivo. *J Neurosci* 27: 4326–4333.

13. Zhang W, Wang T, Qin L, Gao HM, Wilson B, et al. (2004) Efecto neuroprotector del dextrometorfano en el modelo de enfermedad de Parkinson MPTP: papel de la NADPH oxidasa. *FASEB J* 18: 589–591.

14. Yanagihara T, Arai K, Miyamae K, Sato B, Shudo T, et al. (2005) El agua saturada de hidrógeno electrolizada para beber provoca un efecto antioxidante: una prueba de alimentación con ratas. *Biosci Biotechnol Biochem* 69: 1985–1987.

15. Langston JW (2002) El impacto de MPTP en la investigación de la enfermedad de Parkinson: pasado, presente y futuro. En: Factor SA, Weiner WJ, eds. *Enfermedad de Parkinson. Diagnóstico y Manejo Clínico*: Demos Medical Publishing. xx pág.

16. Fornai F, Schlueter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, et al. (2005) Síndrome similar a Parkinson inducido por infusión continua de MPTP: roles convergentes del sistema ubiquitina-proteasoma y alfa-sinucleína. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3413–3418.

17. Stadler K, Bonini MG, Dallas S, Jiang J, Radi R, et al. (2008) Participación de la óxido nítrico sintasa inducible en la peroxidación lipídica mediada por radicales hidroxilo en la diabetes inducida por estreptozotocina. *Free Radic Biol Med* 45: 866–874.

18. Awasthi YC, Sharma R, Sharma A, Yadav S, Singhal SS, et al. (2008) Papel autorregulador del 4-hidroxinonenal en la señalización de la muerte celular programada inducida por estrés. *Free Radic Biol Med* 45: 111–118.

19. Selley ML (1998) (E)-4-hidroxi-2-nonenal puede estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. *Free Radic Biol Med* 25: 169–174.

Expresiones de gratitud

Nos gustaría agradecer a Setsuko Kitamura, por su asistencia técnica, y al Prof. David. A. Brown (UCL, Reino Unido) para la discusión.

Contribuciones de autor

Concibió y diseñó los experimentos: YN MN. Realizó los experimentos: KF TS NY HY KS YY. Analizado los datos: KF TS HY YY. Reactivos/materiales/herramientas de análisis contribuidos: MO HY MAK AT TK YT. Escribió el artículo: KF YN MN. Llevó a cabo la mayoría de los experimentos y escribió el manuscrito: KF. Ratones modelo PD inducidos por MPTP establecidos: TS. Análisis estereológico realizado: NY. Contribuyó a la generación de ratones modelo de EP inducida por MPTP y análisis de comportamiento: HY HY. Análisis estereológico contribuido: KS. Aportación inmunohistoquímica: MO YY MAK. Contribuyó a hacer agua H2: AT.

Medidas de H2 aportadas: YK YT.

20. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, et al. (2003) El superóxido reacciona con la hidroetidina pero forma un producto fluorescente que es claramente diferente del etidio: implicaciones potenciales en la detección de superóxido por fluorescencia intracelular. *Free Radic Biol Med* 34: 1359–1368.

21. Oka S, Ohno M, Tsuchimoto D, Sakumi K, Furuichi M, et al. (2008) Dos vías distintas de muerte celular desencadenadas por daño oxidativo en el ADN nuclear y mitocondrial. *EMBO J* 27: 421–432.

22. Ohno M, Oka S, Nakabeppu Y (2009) Análisis cuantitativo de guanina oxidada, 8-oxoguanina, en ADN mitocondrial por método de inmunofluorescencia. *Métodos Mol Biol* 554: 199–212.

23. Jenner P, Olanow CW (1996) El estrés oxidativo y la patogénesis de Enfermedad de Parkinson. *Neurología* 47: S161–170.

24. Graham DG (1978) Vías oxidativas para catecolaminas en la génesis de neuromelanina y quinonas citotóxicas. *Mol Pharmacol* 14: 633–643.

25. Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, et al. (2007) La inhalación de hidrógeno gaseoso suprime el daño hepático causado por isquemia/reperfusión al reducir el estrés oxidativo. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 670–674.

26. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, et al. (2008) La inhalación de gas hidrógeno reduce el tamaño del infarto en el modelo de rata de lesión por isquemia-reperfusión miocárdica. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 30–35.

27. Ooboshi H, Sadoshima S, Ibayashi S, Yao H, Uchimura H, et al. (1993) La isradipina atenúa la liberación de dopamina inducida por la isquemia en el cuerpo estriado de la rata. *Eur J Pharmacol* 233: 165–168.

28. Katafuchi T, Oomura Y, Yoshimatsu H (1985) Actividad de una sola neurona en el hipotálamo lateral de rata durante el comportamiento de alimentación natural e inducido por 2-desoxi-D-glucosa. *Cerebro Res* 359: 1–9.

29. Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Naini AB, Simonetti S, et al. (1992) Los ratones transgénicos con mayor actividad de superóxido dismutasa de Cu/Zn son resistentes a la neurotoxicidad inducida por N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. *J Neurosci* 12: 1658–1667.

30. Lotharius J, O'Malley KL (2000) El fármaco inductor de parkinsonismo 1-metil-4-fenilpiridinio desencadena la oxidación intracelular de dopamina. Un nuevo mecanismo de toxicidad. *J Biol Chem* 275: 38581–38588.

31. Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T, Murai Y, Minakami S (1990) El 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) induce la formación de superóxido dependiente de NADH y mejora la peroxidación de lípidos dependiente de NADH en partículas de submitocondria de corazón bovino. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1049–1055.

32. Kivlenyi P, St Clair D, Wermer M, Yen HC, Oberley T, Y et al. (1998) La sobreexpresión de superóxido dismutasa de manganeso atenúa la toxicidad de MPTP. *Neurobiol Dis* 5: 253–258.

33. Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV (2001) Complejo I y Enfermedad de Parkinson. *IUBMB Life* 52: 135–141.

34. Beal MF (1992) ¿El deterioro del metabolismo energético da como resultado la muerte neuronal excitotóxica en enfermedades neurodegenerativas? *Ann Neurol* 2: 119–130.

35. Gutteridge JM (1992) Radicales de hierro y oxígeno en el cerebro. *Ann Neurol* 32: T16–21.

36. Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, et al. (2003) La quelación de hierro genética o farmacológica previene la neurotoxicidad inducida por MPTP in vivo: una nueva terapia para la enfermedad de Parkinson. *Neurona* 37: 899–909.

37. Behrens MM, Ali SS, Dao DN, Lucero J, Shekhtman G, et al. (2007) La pérdida de fenotipo de interneuronas de pico rápido inducida por ketamina está mediada por la NADPH oxidasa. *Ciencia* 318: 1645–1647.

38. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, et al. (2006) Imágenes fluorescentes selectivas de superóxido in vivo usando sondas basadas en etidio. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 15038–15043.

39. Chiba Y, Yamashita Y, Ueno M, Fujisawa H, Hirayoshi K, et al. (2005) Células similares a fibroblastos dérmicos murinos cultivados de ratones con senescencia acelerada como modelos in vitro de mayor estrés oxidativo debido a alteraciones mitocondriales. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60: 1087–1098.
40. Drukarch B, van Muiswinkel FL (2001) Neuroprotección para la enfermedad de Parkinson: un nuevo enfoque para un nuevo milenio. *Expert Opin Investig Drugs* 10: 1855–1868.
41. Wu DC, Teismann P, Tieu K, Vila M, Jackson-Lewis V, et al. (2003) NADPH oxidasa media el estrés oxidativo en el modelo de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina de la enfermedad de Parkinson. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6145–6150.
42. Petroske E, Meredith GE, Callen S, Totterdell S, Lau YS (2001) Modelo de ratón de parkinsonismo: una comparación entre el MPTP subagudo y el tratamiento crónico con MPTP/probenecid. *Neurociencia* 106: 589–601.
43. Mitsumoto Y, Watanabe A, Mori A, Koga N (1998) Regeneración espontánea de neuronas dopaminérgicas nigroestriales en ratones C57BL/6 tratados con MPTP. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 660–663.
44. Song DD, Haber SN (2000) Respuestas estriales a la lesión dopaminérgica parcial: evidencia de brotación compensatoria. *J. Neurosci* 20: 5102–5114.
45. Du X, Stull ND, Iacovitti L (1995) El factor neurotrófico derivado del cerebro funciona de manera coordinada con moléculas asociadas para iniciar la expresión de tirosina hidroxilasa en las neuronas estriales. *Cerebro Res* 680: 229–233.
46. Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, et al. (1997) Neuronas dopaminérgicas intrínsecas al cuerpo estriado de los primates. *J. Neurosci* 17: 6761–6768.
47. Meredith GE, Farrell T, Kellaghan P, Tan Y, Zahm DS, et al. (1999) Caracterización inmunocitoquímica de las neuronas catecolaminérgicas en el cuerpo estriado de rata después de las lesiones que agotan la dopamina. *Eur J Neurosci* 11: 3585–3596.
48. Grima B, Lamouroux A, Boni C, Julien JF, Javoy-Agid F, et al. (1987) Un solo gen humano que codifica múltiples tirosina hidroxilasas con diferentes características funcionales predichas. *Naturaleza* 326: 707–711.
49. Greenamyre JT, Hastings TG (2004) Biomedicina. Parkinson: causas divergentes, mecanismos convergentes. *Ciencia* 304: 1120–1122.
50. Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, García-Osuna M, Panov AV, et al. (2000) La exposición sistémica crónica a pesticidas reproduce características de la enfermedad de Parkinson. *Nat Neurosci* 3: 1301–1306.
51. Ho'glinger GU, Carrard G, Michel PP, Medja F, Lombe's A, et al. (2003) Disfunción del complejo mitocondrial I y el proteasoma: interacciones entre dos déficits bioquímicos en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson. *J Neurochem* 86: 1297–1307.
52. Rommelfanger KS, Edwards GL, Freeman KG, Liles LC, Miller GW, et al. (2007) La pérdida de norepinefrina produce déficits motores más profundos que el tratamiento con MPTP en ratones. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 13804–13809.
53. Ohashi S, Mori A, Kurihara N, Mitsumoto Y, Nakai M (2006) La gravedad relacionada con la edad de la neurodegeneración dopaminérgica a la neurotoxicidad MPTP causa disfunción motora en ratones C57BL/6. *Neurosci Lett* 401: 183–187.
54. Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Daño oxidativo y deterioro mitocondrial en el envejecimiento. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10771–10778.
55. Iida T, Furuta A, Kawashima M, Nishida J, Nakabeppu Y, et al. (2001) Acumulación de 8-oxo-29-desoxiguanosina y aumento de la expresión de la proteína hMTH1 en tumores cerebrales. *Neurooncol* 3: 73–81.
56. Shimura-Miura H, Hattori N, Kang D, Miyako K, Nakabeppu Y, et al. (1999) Aumento de 8-oxo-dGTPasa en las mitocondrias de las neuronas de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson. *Ann Neurol* 46: 920–924.
57. Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, et al. (2001) El daño oxidativo es el evento más temprano en la enfermedad de Alzheimer. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 759–767.
58. Kikuchi H, Furuta A, Nishioka K, Suzuki SO, Nakabeppu Y, et al. (2002) Deterioro de las enzimas de reparación del ADN mitocondrial contra la acumulación de 8-oxo-guanina en las neuronas motoras espinales de la esclerosis lateral amiotrófica. *Acta Neuropathol* 103: 408–414.
59. Tsuzuki T, Egashira A, Igarashi H, Iwakuma T, Nakatsuru Y, et al. (2001) Tumorigénesis espontánea en ratones defectuosos en el gen MTH1 que codifica la 8-oxo-dGTPasa. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11456–11461.
60. Sakamoto K, Tominaga Y, Yamauchi K, Nakatsu Y, Sakumi K, et al. (2007) Los ratones sin MUTYH son susceptibles a la tumorigénesis intestinal espontánea e inducida por estrés oxidativo. *Cáncer Res* 67: 6599–6604.
61. Sakumi K, Tominaga Y, Furuichi M, Xu P, Tsuzuki T, et al. (2003) Tumorigénesis pulmonar asociada a la inactivación de Ogg1 y su supresión por alteración del gen Mth1. *Cáncer Res* 63: 902–905.
62. Franklin KB, Paxinos G (2001) El cerebro del ratón en coordenadas estereotáxicas (Nueva York: Academic Press).
63. Kajitani K, Nomaru H, Ifuku M, Yutsudo N, Dan Y, et al. (2009) Galectin-1 promueve la proliferación basal e inducida por kainato de progenitores neurales en la circunvolución dentada del hipocampo de ratón adulto. La muerte celular difiere 16: 417–27.
64. Mallajosyula JK, Kaur D, Chinta SJ, Rajagopalan S, Rane A, et al. (2008) La elevación de MAO-B en astrocitos de cerebro de ratón da como resultado la patología de Parkinson. *PLoS One* 3: e1616.
65. Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, et al. (2007) Participación de interferón-gamma en la pérdida de neuronas dopaminérgicas mediada por microglial. *J Neurosci* 27: 3328–37.
66. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991) Estimación estereológica imparcial del número total de neuronas en las subdivisiones del hipocampo de rata utilizando el fraccionador óptico. *Rec. Anat* 231: 482–497.
67. Crabbe JC, Rigter H, Kerbusch S (1982) Análisis de respuestas conductuales a un análogo de ACTH en ratones consanguíneos recombinantes CXB/By. *Behav Brain Res* 4: 289–314.
68. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, et al. (1996) Papel del óxido nítrico neuronal en la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina). *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 93: 4565–4571.
69. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, et al. (1999) La sintasa de óxido nítrico inducible estimula la neurodegeneración dopaminérgica en el modelo MPTP de la enfermedad de Parkinson. *Nat Med* 5: 1403–1409.

