



# El hidrógeno molecular en el agua potable protege contra Cambios neurodegenerativos inducidos por un cerebro traumático Lesión

Kenji Dohi<sup>1,2</sup>, Brian C. Kraemer<sup>1,3,4</sup>, Michelle A. Erickson<sup>1</sup>, Pamela J. McMillan<sup>4,5</sup>, Andrej Kovac<sup>1,3</sup>, Zuzana Flachbartova<sup>6</sup>, Kim M. Hansen<sup>1,3</sup>, Gul N. Shah<sup>7</sup>, Nader Sheibani<sup>8</sup>, Teresa Salameh<sup>1,3</sup>, William A. Banks<sup>1,3\*</sup>

**1** Geriatric Research Education and Clinical Center, Veterans Affairs Puget Sound Health Care System, Seattle, WA, Estados Unidos de América, **2** Department of Emergency Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokio, Japón, **3** Division of Gerontology and Geriatric Medicine, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, Estados Unidos de América, **4** Mental Illness Research Education and Clinical Center, Veterans Affairs Puget Sound Health Care System, Seattle, WA, Estados Unidos de América, **5** Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, University of Washington, Seattle, WA, United States of America, **6** Laboratory of Biomedical Microbiology and Immunology, Department of Microbiology and Immunology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Kosice, Slovakia, **7** Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, Saint Louis University School of Medicine, Edward A. Doisy Research Center, St. Louis, MO, United States of America, **8** Ophthalmology and Visual Sciences, University of Wisconsin School of Medicine y Salud Pública, Madison, WI, Estados Unidos de América

## Abstracto

La lesión cerebral traumática (TBI) en sus diversas formas se ha convertido en un problema importante para la sociedad moderna. El TCE agudo puede transformarse en una condición crónica y ser un factor de riesgo para enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, probablemente a través de la inducción de estrés oxidativo y neuroinflamación. Aquí, examinamos la capacidad del hidrógeno molecular antioxidante que se administra en el agua potable (agua de hidrógeno molecular; mHW) para alterar los cambios agudos inducidos por el impacto cortical controlado (CCI), un modelo experimental de TBI de uso común. Descubrimos que mHW revirtió el edema inducido por CCI en aproximadamente la mitad, bloqueó completamente la expresión patológica de tau, acentuó un aumento temprano observado en varias citoquinas pero atenuó ese aumento en el día 7, revirtió los cambios observados en los niveles de proteína de acuaporina-4, HIF-1, MMP-2 y MMP-9, pero no para el péptido beta amiloide 1-40 o 1-42. El tratamiento con mHW también revirtió el aumento observado 4 h después de la CCI en la expresión génica relacionada con el metabolismo de oxidación/carbohidratos, liberación de citoquinas, migración de leucocitos o células, transporte de citoquinas, ATP y unión de nucleótidos. Finalmente, encontramos que mHW preservó o aumentó los niveles de ATP y proponemos un nuevo mecanismo para mHW, el de la producción de ATP a través de la reacción de Jagendorf. Estos resultados muestran que el hidrógeno molecular administrado en el agua potable revierte muchas de las secuelas de la CCI y sugiere que podría ser un tratamiento altamente efectivo y fácil de administrar para la TBI.

Cita: Dohi K, Kraemer BC, Erickson MA, McMillan PJ, Kovac A, et al. (2014) El hidrógeno molecular en el agua potable protege contra los cambios neurodegenerativos inducidos por una lesión cerebral traumática. PLoS ONE 9(9): e108034. doi:10.1371/journal.pone.0108034

Editor: Tsuneya Ikezu, Facultad de Medicina de la Universidad de Boston, Estados Unidos de América

Recibido el 23 de mayo de 2014; Aceptado el 18 de agosto de 2014; Publicado el 24 de septiembre de 2014.

Este es un artículo de acceso abierto, libre de derechos de autor, y puede ser reproducido, distribuido, transmitido, modificado, construido o utilizado libremente por cualquier persona para cualquier propósito legal. El trabajo está disponible bajo la dedicación de dominio público Creative Commons CC0.

Disponibilidad de datos: los autores confirman que todos los datos subyacentes a los hallazgos están totalmente disponibles sin restricciones. Todos los datos relevantes están dentro del documento.

Financiamiento: KD recibió el apoyo de la subvención Kiban C número 23592683. WAB recibió el apoyo de VA Merit Review; RO-1 AG029839. WAB y GNS fueron compatibles con RO 1 DK083485. BCK recibió el apoyo de VA Merit Review; RO-1 NS064131. 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: wabanks1@uw.edu

## Introducción

La lesión cerebral traumática (TBI, por sus siglas en inglés) se ha convertido en una lesión característica de principios del siglo XXI. Además de las lesiones por onda expansiva en los escenarios de guerra, la TBI en la población civil adopta muchas formas y recientemente las caídas han suplantado a los accidentes automovilísticos como la causa más común de TBI [1,2]. Las lesiones que penetran el cráneo son más raras pero constituyen una forma muy grave de TCE [3]. Aunque la LCT surge de una variedad de lesiones, se cree que los criterios de valoración clínicos que resultan y los mecanismos que impulsan al SNC hacia esos criterios de valoración son compartidos no solo entre las LCT, sino también por una gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas [4,5]. Estos criterios de valoración y mecanismos incluyen edema cerebral, tauopatía, interrupción y disfunción de la barrera hematoencefálica (BBB) y neuroinflamación [6,7,8]. Una vez que se ponen en marcha, estos procesos a menudo se refuerzan a sí mismos a menos que

el ciclo puede ser interrumpido. Por lo tanto, se necesitan terapias preventivas e intervenciones para tratar la LCT lo antes posible.

Idealmente, estos tratamientos podrían administrarse inmediatamente, incluso en el momento de la lesión. Esto requeriría que el agente terapéutico tuviera baja toxicidad y que se administrara fácilmente. Uno de estos potenciales terapéuticos es el hidrógeno molecular. Presentado por primera vez por Ohsawa et al en 2007 [9], el hidrógeno molecular actúa al menos en parte como un antioxidante, combinándose con iones hidroxilo que se producen por lesiones del SNC, aunque también pueden existir otros mecanismos [9]. Como molécula sin carga de bajo peso molecular (2 Da), el hidrógeno molecular tiene la capacidad de penetrar las membranas biológicas. Las membranas penetradas incluirían aquellas que forman la BBB; por lo tanto, el hidrógeno molecular debería tener acceso sin restricciones al SNC, una característica compartida con pocas terapias potenciales. Esta alta penetrabilidad de la membrana explica por qué el hidrógeno molecular

tiene efectos terapéuticos cuando se administra por una variedad de vías. Aquí, investigamos los efectos del hidrógeno molecular administrado en el agua potable (mHW), un método de administración que debería ser fácilmente traducible a situaciones clínicas, en el edema cerebral, la patología tau, la neuroinflamación y la expresión génica inducida por impacto cortical controlado (CCI), un modelo animal de TBI.

El modelo CCI de TBI que usamos aquí es uno de los modelos estándar de oro y proporciona una cantidad controlada, reproducible y cuantificada de fuerza mecánica al cerebro. Según la clasificación de Cernak [3], se trata de un modelo dinámico de lesión penetrante de impacto directo que produce una contusión directa del tejido cerebral. Reproduce muchas de las características de la LCT que se observan en los pacientes, incluido el edema cerebral, las alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral y los cambios metabólicos, y se usa ampliamente tanto en las investigaciones de los mecanismos de la LCT como para el desarrollo de fármacos [4,10].

## Materiales y métodos

Se usó un

impactador estereotáctico CCI modelo A (Leica Microsystems, Inc) para inducir CCI en ratones macho C57BL/6 de 8 semanas de edad (Harlan Sprague Dawley). Todos los estudios se realizaron bajo protocolos aprobados por el comité local de cuidado y uso de animales en el Departamento de Asuntos de Veteranos.

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Puget Sound, una instalación aprobada por AAALAC, y todos los estudios se adherieron a la Guía NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio. La anestesia se indujo con isoflurano (2-4% a 0,5 l/min) y se mantuvo mediante la administración con un cono nasal. Se afeitó la cabeza, se infiltró la piel que recubre el cráneo con una mezcla de lidocaína/bupivacaína y se montó el ratón en un aparato estereotáctico que es parte de un dispositivo de compresión neumático contenido en trazos Lighthall. Utilizando una técnica estéril, se expuso el cráneo a través de una incisión en la línea media y se retrajo la piel y el músculo. Se hizo una abertura de 4 mm de diámetro en el cráneo, 3 mm lateral y 2 mm caudal del bregma, exponiendo así la corteza parietotemporal derecha.

Se extrajo el hueso y se cortó la duramadre para exponer la corteza. La corteza se comprimió utilizando el dispositivo impactador para aplicar un peso de punta plana de 3 mm de diámetro a una velocidad de 5,82 m/s a una profundidad

de 1,2 mm durante una duración de 47 ms a una presión de accionamiento de 73 psi. El área lesionada se cubrió con una dura artificial de 4 mm de diámetro (GORE Peclude, WL Gore & Associates, Newark, NY) y una placa de hueso artificial de 5 mm de diámetro hecha de cemento dental (GC Fuji I, GC Corporation, Tokio, Japón), la piel volvió a colocarse en su lugar y se cementó, se suspendió el isoflurano y el ratón se colocó en una incubadora a 37 °C hasta que recuperó la conciencia (retorno del reflejo de enderezamiento y movilidad). Los ratones simulados pasaron por todo el procedimiento excepto por la entrega del impacto.

## Producción y Administración de mHW

El mHW se preparó disolviendo hidrógeno molecular (H<sub>2</sub>) en agua a alta presión (1,6–1,8 ppm) hasta un nivel sobresaturado utilizando un aparato de producción de hidrógeno y agua (Arega Co, Aichi Japón). El mHW saturado se mantuvo en una bolsa de aluminio hasta su uso y se preparó cada semana y solo se usó agua con un contenido mínimo de hidrógeno de 1,6 mM. Los ratones se colocaron en mHW como su única fuente de agua potable desde 24 h antes de la CCI/cirugía simulada hasta el estudio. El agua potable mHW se suministró en botellas de agua de vidrio que tenían un cojinete de bolas de acero inoxidable; el cojinete de bolas evita la desgasificación del hidrógeno molecular. Descubrimos que los patrones de bebida, alimentación y aseo no diferían entre los ratones CCI y los falsos y que ni el inicio de la bebida ni la cantidad de agua bebida en 24 h fueron alterados por CCI (datos no mostrados).

## edema cerebral

Los cerebros se recolectaron 24 h después de la cirugía simulada o 24 h, 3 días (72 h) o 7 días después de la CCI (n = 4–5/grupo). Se pesó (peso húmedo) la hemisferia ipsilateral a la CCI o cirugía simulada, se colocó en recipientes de metal que se colocaron en una placa de calentamiento a 125 °C durante 24 h, se volvió a pesar (peso seco) y se determinó el porcentaje de agua mediante la ecuación:

$$\text{Contenido de agua} \sim \delta \text{ peso húmedo} \{ \text{peso seco} = \text{peso húmedo} - \text{peso seco} \}$$

Además, se aplicó el índice de edema de Keep et al [11] a el punto de tiempo de 24 h usando la ecuación:

$$\text{Índice de edema} \sim \delta \text{ peso húmedo} \{ \text{peso seco} = \text{peso seco} - \text{peso húmedo} \}$$

## inmunohistoquímica

Los ratones fueron examinados por inmunohistoquímica y las imágenes presentadas son representativas de cada grupo. Para preparar el tejido para el análisis, los ratones fueron anestesiados y fijados mediante perfusión transcardial con paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los cerebros, se incluyeron en parafina y las secciones coronales se cortaron a 10 mm de espesor y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. Las secciones fueron inmunes

teñido con AT8 (1:250), Alz50 (1:25), GFAP (1:400) e IBA1 (1:1000). Las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas a través de alcoholes, y se usó un paso de recuperación de antígeno que consiste en pretratamiento térmico por microondas o autoclave en solución de recuperación de objetivo DakoCytomation (Vector, Burlingame, CA).

Las secciones se trataron para peroxididas endógenas con peróxido de hidrógeno al 3 % en PBS (pH 7,4), se bloquearon en leche descremada al 5 % en PBS, se incubaron con el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C, seguido del anticuerpo secundario biotinilado durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se incubaron en un complejo de avidina biotina (Vector's Vectastain Elite ABC kit, Burlingame, CA) y el producto de reacción se visualizó con 0.05%

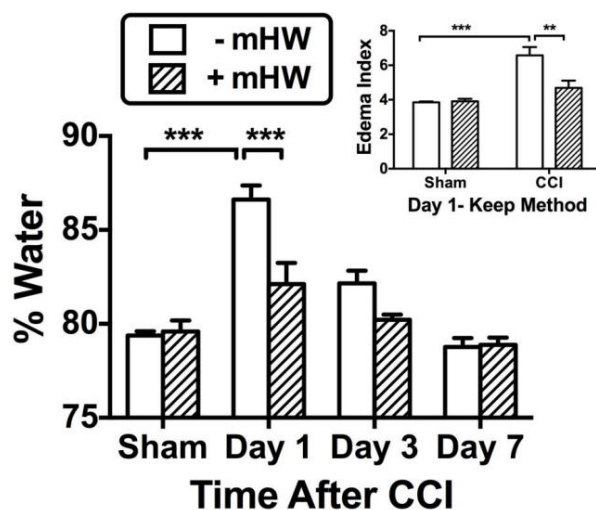


Figura 1. Efectos de CCI y mHW en el edema cerebral. La figura principal muestra que el porcentaje del peso del cerebro que era agua aumentó 24 h (día 1) después de la CCI y que mHW redujo significativamente el contenido de agua. El recuadro muestra el índice de edema cerebral calculado por el método Keep a las 24 h; CCI aumentó el índice de edema, mientras que mHW fue protector.

\*\*p,0,01,

\*\*\*p,0,001. doi:10.1371/journal.pone.0108034.g001

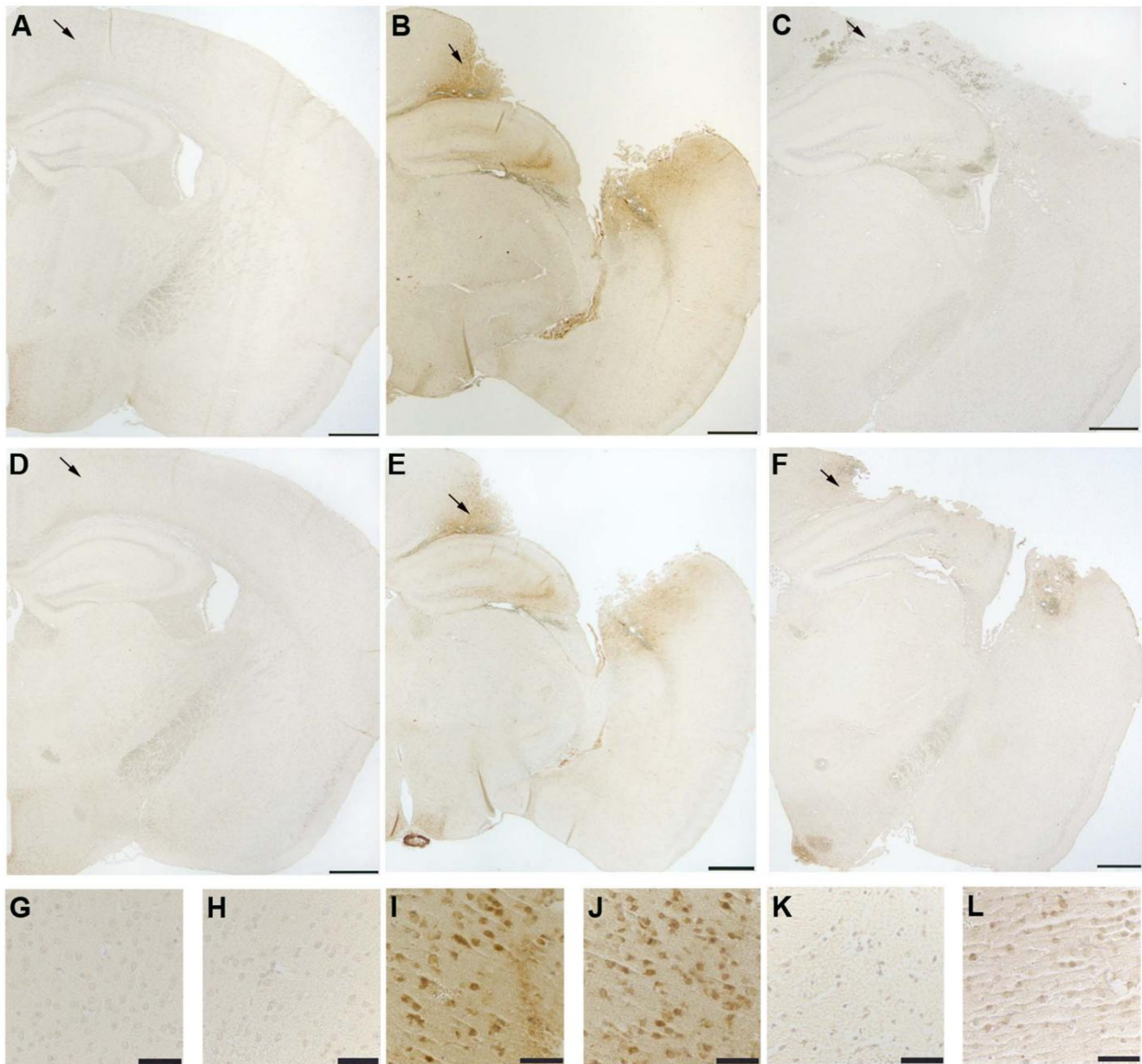


Figura 2. Reducción de la expresión patológica de tau inducida por CCI en hipocampo y corteza por mHW. El aumento inducido por CCI en la inmunoreactividad de AT8 y Alz50 se atenúa mediante el tratamiento con agua hidrogenada. Imágenes representativas de inmunotinción en cerebros de animales simulados (A, D, G, H), CCI (B, E, I, J) y tratados con CCI+mHW (C, F, K, L). Las imágenes representativas de baja potencia muestran la inmunoreactividad de AT8 (A–C) y Alz50 (D–F). G–L, imágenes de alta potencia de la región cortical designada por flechas, inmunoteñidas para AT8 (G,I,K) y Alz50 (H, J, L). Barras de escala: 500 mm, A–F; 50 mm, G–L.

doi:10.1371/journal.pone.0108034.g002

diaminobencidina (DAB)/peróxido de hidrógeno al 0,01% en PBS.

Los controles negativos con anticuerpo secundario solo no inmunoteñieron las secciones de tejido (datos no mostrados). Las fotomicrografías se tomaron con una cámara digital y se importaron a Adobe Photoshop para su montaje. Para optimizar la visualización de la tinción, se modificaron las fotomicrografías, cuando fue necesario, ajustando el brillo y el contraste.

#### Estudios de ARNm

Los ratones se dividieron en 3 grupos de 6 cada uno. El grupo 1 se sometió a una cirugía simulada, el grupo 2 se sometió a una CCI y el grupo 3 se sometió a una CCI pero comenzó con mHW 24 h antes de la CCI. Todos los ratones fueron

sacrificado 4 h después de la cirugía CCI/simulada, y se recogió el hemisocoro ipsilateral a la cirugía. El ARN se extrajo de dos hemisocoros combinados usando el kit MN nucleopsina II (Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA). Las bibliotecas de mRNA-seq se construyeron utilizando el kit ScriptMiner (Epicentre, Madison, SI) y se secuenciaron con química TruSeq v3 en un HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA). Los datos se analizaron con las herramientas de filtrado del software GeneSifters (Geospiza, Seattle, WA).

#### Homogeneizado de

cerebro El hemisocoro ipsilateral a la CCI/cirugía simulada se homogeneizó en 1 ml de tampón de extracción (tampón de fosfato 0,01 M).



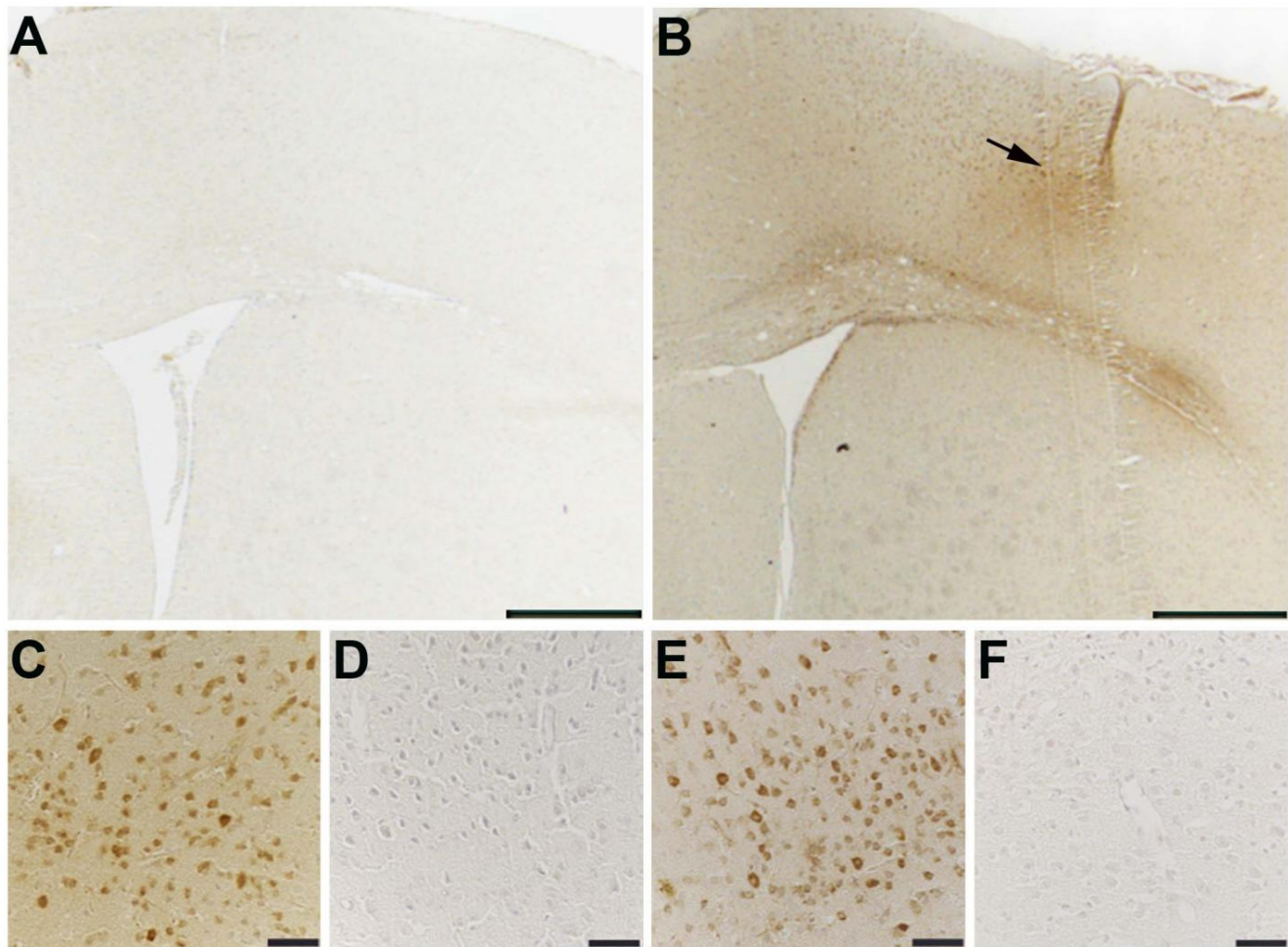


Figura 3. Reducción de tau patológica inducida por CCI por mHW en la corteza frontal. Los aumentos inducidos por CCI en la inmunorreactividad de AT8 y Alz50 se extienden a la corteza frontal y se atenúan mediante el tratamiento con agua hidrogenada. Las imágenes representativas de baja potencia demuestran una mayor inmunorreactividad de AT8 en la corteza frontal de CCI (B) en comparación con los ratones tratados con simulación (A). C–F, las imágenes de alta potencia de la región cortical que se muestra en B (flecha) demuestran la inmunorreactividad de AT8 (C,D) y Alz50 (E,F) en ratones tratados con CCI (C,E) y HW (D,F). Barras de escala: 500 μm, A,B; 50 μm, D–F. doi:10.1371/journal.pone.0108034.g003

solución salina (PBS; cloruro de potasio 2,7 mM, cloruro de sodio 0,137 M, pH 7,4) 2,7 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, cóctel inhibidor de proteasa) usando un mini batidor de perlas a 4800 RPM durante 30 segundos para producir el homogeneizado de PBS. Se añadió Triton X-100 al homogeneizado de PBS hasta una concentración final del 0,1 % y se agitó vigorosamente. A continuación, el homogeneizado se centrifugó a 20.000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se utilizó para medir las citocinas cerebrales y el péptido beta amiloide (Ab). Se añadió Triton X 100 a una tercera porción de homogeneizado de PBS hasta una concentración final del 1 %, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 20 000 g durante 10 min a 4 °C. Se midió el nivel de proteína del sobrenadante resultante (BCA, Pierce, Rockford, IL) y se ajustó a 4 mg/ml con tampón de extracción que contenía Triton X-100 al 1 % y se congeló a 280 °C como la extracción con Triton X-100 al 1 %.

Se congelaron alícuotas de esta extracción y se usaron para todos los Western y dot blot excepto para el inmunoblot pan-tau.

Para la detección total de tau, se diseccionaron cerebros de ratones de animales sacrificados y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido antes de la extracción. Los hemisferios cerebrales de los ratones se homogeneizaron en un tampón de reensamblaje con alto contenido de sal (RAB-High Salt [MES 0,1 M, EGTA 1 mM, MgSO<sub>4</sub> 0,5 mM, NaCl 0,75 M, NaF 0,02 M, PMSF 0,5 mM, cóctel inhibidor de proteasa al 0,1 %, pH 7,0]). Para

inmunotransferencia semicuantitativa, detectamos tau humana y de ratón usando el anticuerpo pan-tau 17025 (proporcionado como un generoso regalo de Virginia Lee, ver [12] para más detalles) a una dilución de 1:3000 como se describió anteriormente [13] y anticuerpo anti-actina a 1:1000 (DSHB). El policlonal de conejo 17025 es un anticuerpo pan-tau que reconoce la tau humana y de ratón total frente a la tau recombinante de longitud completa.

#### Mediciones de citocinas en suero y cerebro A las 4

h, 24 h y 7 días después de la CCI o la cirugía simulada, los ratones se anestesiaron con uretano, la arteria carótida se expuso, se cortó y se extrajo sangre de ella, y se obtuvo el hemiserebro ipsilateral a la CCI/ cirugía simulada y se procesó como se indicó anteriormente; el extracto de Triton X-100 al 0,1 % se usó para medir las citocinas cerebrales. La sangre arterial se centrifugó a 4500 g durante 10 min a 4 °C y se midieron los niveles de citocinas en el suero resultante. Los niveles de citocinas cerebrales se midieron en los puntos de tiempo de 4 h, 24 h y 7 días y las citocinas séricas en los puntos de tiempo de 24 h y 7 días. Se utilizó el kit multiplex para citocinas murinas de BioRad y mide 23 citocinas: IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-13, IL-17, Eotaxina (CCL11), G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, KC (CXCL1), MCP-1 (CCL2), MIP-1a

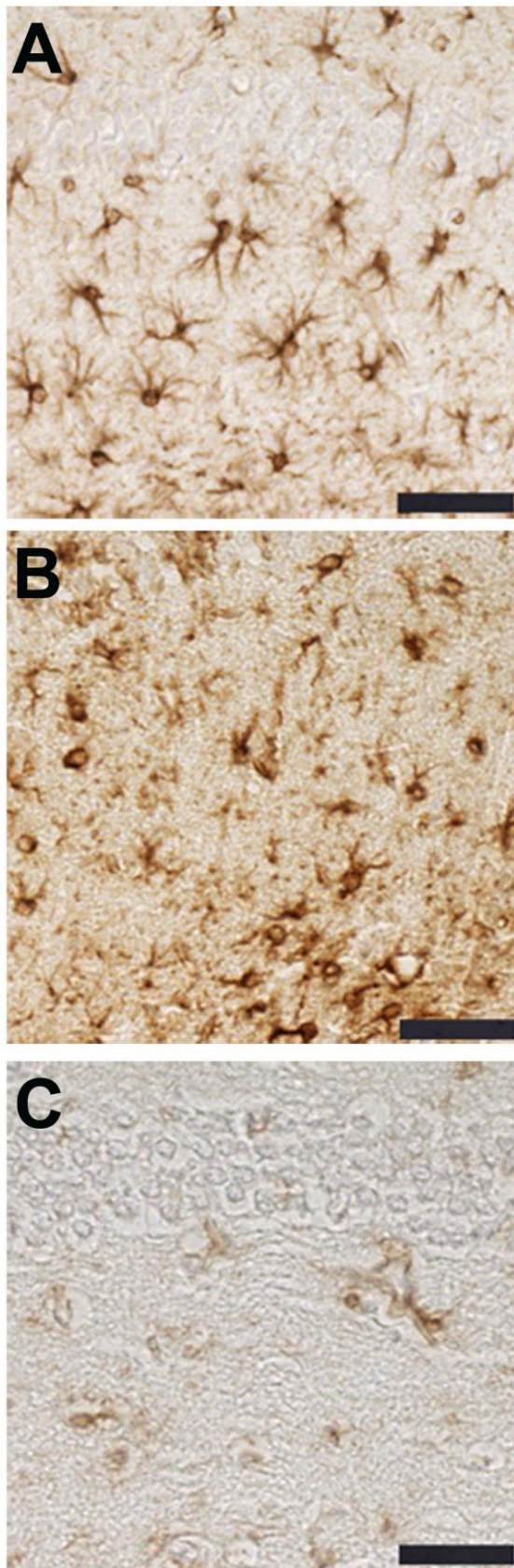


Figura 4. La inmunorreactividad de GFAP está disminuida en el campus de hipocampo (CA1 stratum radiatum) de ratones CCI tratados con agua hidrogenada. Las imágenes representativas demuestran niveles similares de

Inmunorreactividad de GFAP del hipocampo en ratones simulados (A) y CCI (B). La inmunotinción para GFAP se reduce considerablemente en el hipocampo de animales tratados con agua hidrogenada (C). Barras de escala: 50 mm. doi:10.1371/journal.pone.0108034.g004

(CCL3), MIP-1b (CCL4), RANTES (CCL5) y TNF- $\alpha$ . Los niveles cerebrales se informaron en relación con el contenido de proteína de la muestra de cerebro y se informan como pg/mg.

### Dot blots para ciclofilina A y proteína precursora de amiloide (APP)

Los cerebros extraídos en Triton X-100 al 1% se analizaron para determinar la expresión de APP y ciclofilina A mediante dot blot como se describió anteriormente [14]. Brevemente, se cargaron 2  $\mu$ g de proteína en un volumen de 250  $\mu$ l de PBS en pocillos duplicados de un aparato de microfiltración Bio-dot (Biorad). Para normalizar la sensibilidad de los anticuerpos, también se preparó una curva estándar utilizando una de las muestras de control con cantidades de proteína por pocillo que oscilaban entre 0,125 y 4  $\mu$ g en un volumen de 250  $\mu$ l de PBS y se cargó por duplicado. Las muestras y los estándares se unieron a una membrana de nitrocelulosa mediante vacío, la membrana se lavó, se bloqueó en leche al 5% y se incubó durante la noche con anticuerpo APP (Epitomics, 1 mg/ml) o anticuerpo CypA (Epitomics, 1 mg/ml) en tampón de bloqueo. Luego se lavó la membrana en PBS, y se preparó secundaria anti-conejo (Santa Cruz) 1:5000 en leche al 5% y se incubó con las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente.

temperatura. Después del lavado, la señal se visualizó con sustrato quimioluminiscente West Pico. Las imágenes se capturaron utilizando un ImageQuant LAS4000 y el software IQTL utilizado para cuantificar las intensidades de los puntos. Se generó una curva estándar utilizando intensidades puntuales de los estándares con el software Graphpad Prism, y la intensidad puntual de cada muestra se normalizó a la curva estándar antes del análisis estadístico.

### Ensayos de

Ab Se usaron kits ELISA sándwich que detectan Ab40 o Ab42 de roedor (Wako) para cuantificar los niveles de Ab. Los extractos de Triton X-100 al 0,1% se diluyeron 1:1 en el diluyente estándar proporcionado en el kit y, posteriormente, se analizaron de acuerdo con las instrucciones del kit. Hemos descubierto que estos kits detectan específicamente Ab40 y Ab42 de roedores, como lo demuestra la ausencia de señal para ambos analitos en cerebros sin APP procesados y analizados de forma idéntica. Además, este kit ha sido utilizado por otros grupos para cuantificar los cambios en roedores Ab en envejecimiento [15] y lesiones por onda expansiva [16]. En el último estudio, se informó que la mayoría de los anticuerpos de roedores detectados por este ensayo se encuentran en la fracción Triton-X [16].

Homogenizados cerebrales para acuaporina-4 (AQP-4), Hipoxia inducible Factor 1 alfa (HIF-1), metaloproteína de matriz (MMP) -2 y -9 El hemibrain ipsilateral a la

cirugía CCI/simulada fue homogénea y extraída en el tampón trised-TA-extracción (20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 2 mM de 2%, 2 mM de TITON, 2 mM). inhibidores de la proteasa. Los extractos de cerebro se corrieron en geles Bis Tris al 4-12% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Invitro gen, EE. UU.). Las membranas se probaron con anticuerpos primarios AQP-4 (Abcam, EE. UU.), HIF-1 $\alpha$  (Novus Biologicals, EE. UU.), MMP-2 (R&D Systems, EE. UU.) y MMP-9 (R&D Systems, EE. UU.), seguidos de anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz, EE. UU.). Para verificar la uniformidad de las membranas de carga de proteínas, se retiraron y reprobaron con GAPDH o anticuerpo b-actina (Cell Signaling Technology, EE. UU.). El western blot de quimioluminiscencia mejorada se digitalizó con un sistema de imágenes CCD LAS4000 (GE Healthcare, EE. UU.) y se analizó con el software ImageQuant TL.



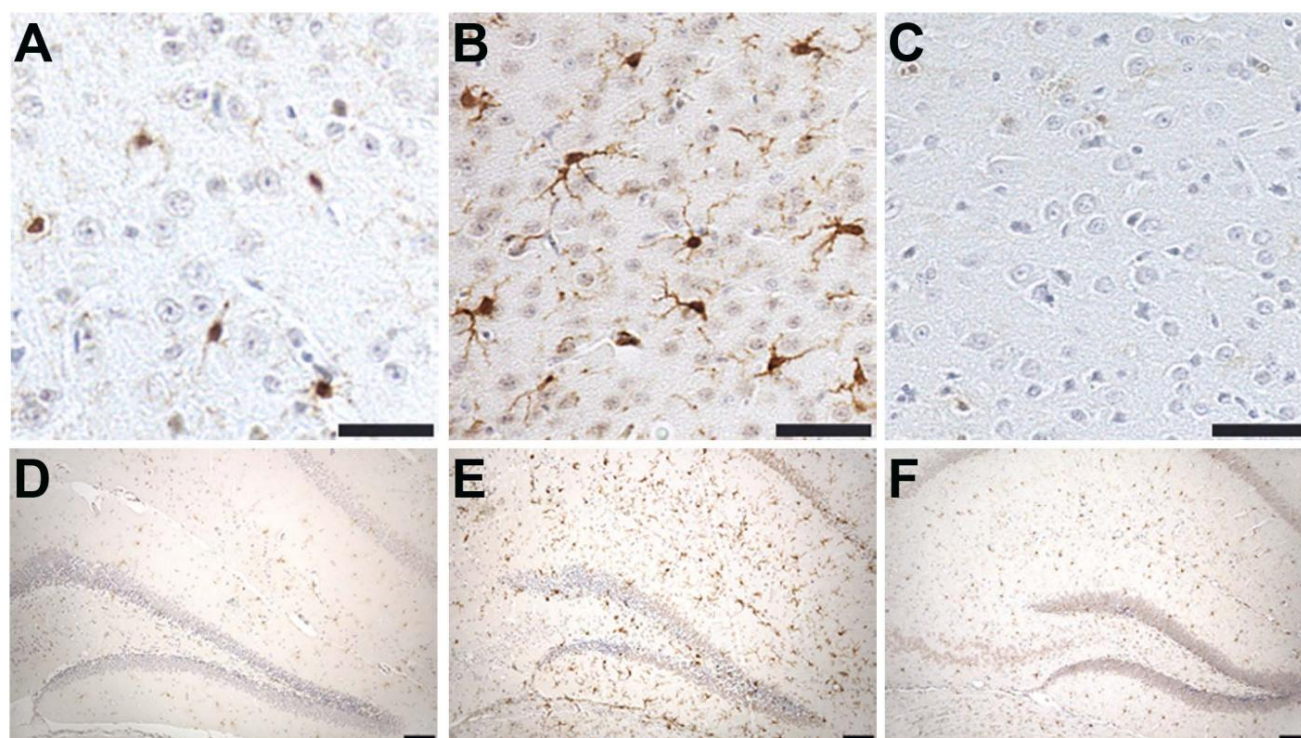


Figura 5. El aumento de la inmunoreactividad de Iba1 inducido por CCI se atenúa mediante el tratamiento con agua hidrogenada. Las imágenes representativas son de la inmunoreactividad de Iba1 en la corteza adyacente al sitio de la lesión (A–C) y el hipocampo (D–F) de animales simulados (A,D), CCI (B,E) y tratados con CCI/HW (C,F). Barras de escala: 50 mm, A–C; 100 mm, D–F. doi:10.1371/journal.pone.0108034.g005

#### Salida de cerebro a sangre de Ab y reabsorción de LCR

El eflujo del cerebro a la sangre de Ab marcado radiativamente y albúmina se midió como se describió previamente [17]. Ab1-40 murino se marcó radiativamente con  $^{125}\text{I}$  y albúmina sérica humana con  $^{131}\text{I}$  mediante el método de la cloramina-T y se purificó en columnas de Sephadex G-10. Los ratones recibieron una inyección de 25.000 cpm de I-Ab y 25.000 cpm de I-albúmina en el ventrículo lateral del cerebro contralateral a CCI y 10 minutos más tarde se extrajo el cerebro. Se utilizaron ratones que habían estado muertos entre 10 y 30 minutos para estimar la cantidad de ligando radiactivo disponible para el transporte. La cantidad de ligando radiactivo transportado se calculó como la diferencia entre el valor de 10 minutos en ratones vivos y el valor de 10 minutos en ratones muertos.

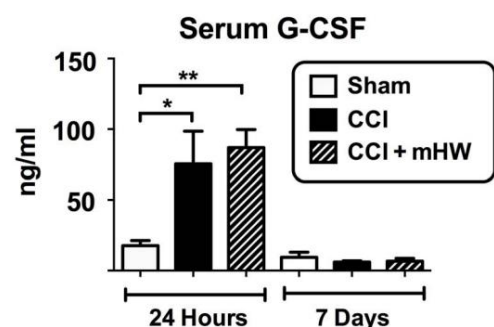


Figura 6. Efectos de CCI y mHW en los niveles de citoquinas en suero. Solo el G-CSF se elevó en sangre después de la ICC y solo a las 24 h. No hubo un efecto estadísticamente significativo de mHW en los niveles séricos de G-CSF. \*p, 0,05; \*\*p,0,01. doi:10.1371/journal.pone.0108034.g006

#### Efectos de mHW en la respiración celular y la producción de ATP

Células de pericito cerebral de ratón condicionalmente inmortalizadas (ImBPC) establecidas como se describió previamente [18] se cultivaron en medio de crecimiento, que consistía en medios esenciales mínimos Dulbecco (DMEM) de glucosa 5,5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, aminoácidos no esenciales (NEAA), interferón- $\gamma$  (44 U/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), penicilina (100 U/ml) y estreptomina (0,1 mg/ml). Todos los cultivos se mantuvieron a 33°C bajo 5% de  $\text{CO}_2$ . Para los experimentos con células pretratadas, los medios se prepararon recientemente usando mHW (1,6 mM) o agua desionizada con polvo de medios mínimos esenciales (DMEM) de Dulbecco (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, aminoácidos no esenciales (NEAA), interferón- $\gamma$  (44 U/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), penicilina (100 U/ml) y estreptococos. micina (0,1 mg/ml). Las células para los experimentos del analizador Seahorse se recogieron utilizando EDTA que contenía 16 tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una densidad de 56104 células/pocillo. Se usó un n = 10 en cada experimento y cada experimento se completó al menos tres veces. Las células para el ensayo de ATP se recogieron y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 56103 células/pocillo. Se usó un n = 8 en cada experimento y cada experimento se com

Se usó un analizador de flujo extracelular Seahorse Bioscience XF24 (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA) para medir la tasa de metabolismo oxidativo de la glucosa (respiración). En condiciones típicas de cultivo celular in vitro, la tasa de consumo de oxígeno (OCR) es un indicador de la respiración mitocondrial y la tasa de acidificación extracelular (ECAR) es predominantemente una medida del ácido láctico formado durante el metabolismo de la energía glucolítica.

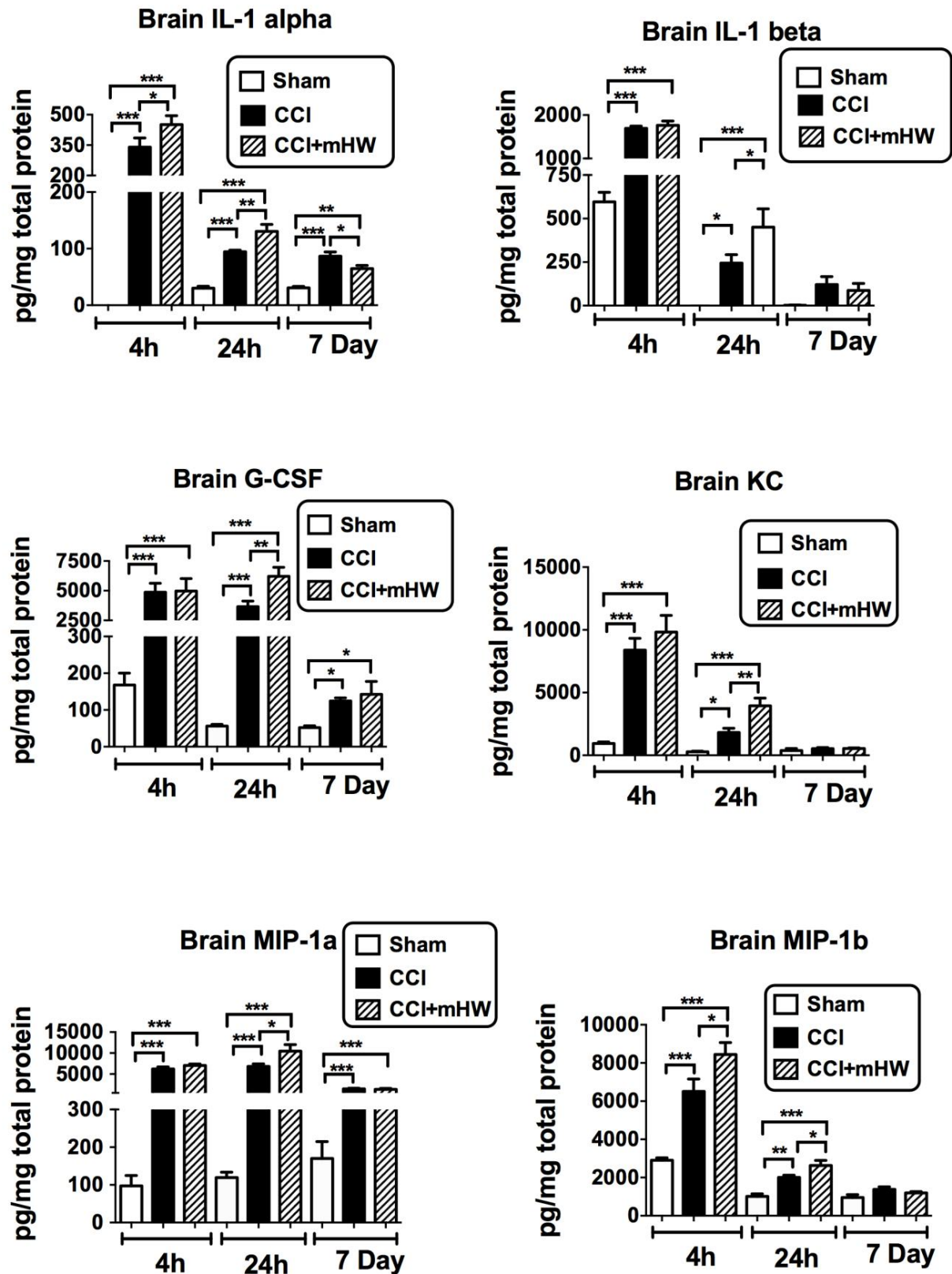


Figura 7. Las elevaciones inducidas por CCI en seis citoquinas en el cerebro se vieron afectadas por mHW. IL-6 (no se muestra; consulte los resultados en la Tabla 1) tenía un patrón similar a G-CSF. Excepto por el valor de IL-1a del día 7, los efectos estadísticamente significativos de mHW fueron aumentar aún más los niveles de citoquinas en el cerebro. \*p,0,05; \*\*p,0,01; \*\*\*p,0,001.

doi:10.1371/journal.pone.0108034.g007

**Costs**



Tabla 2. Cambios en la Expresión Cerebral con CCI y mHW: Procesos Biológicos.

Procesos Biológicos Puntuación Z positiva	# genes afectados	# en conjunto de genes	Puntuación Z
Regulación positiva del transporte de citoquinas	3	33	5.21
Regulación positiva de la secreción hormonal.	4	61	4.91
Regulación positiva de la secreción	7	170	4.72
Homeostasis de carbohidratos	4	67	4.62
Homeostasis de glucosa	4	67	4.62
Regulación de la Actividad Oxidorreductasa	3	41	4.56
Quimiosíntesis de leucocitos	4	74	4.32
Regulación de la secreción de citoquinas	3	45	4.30
Migración de leucocitos	5	114	4.17
Comportamiento de alimentación	4	83	3.99
Secreción de citoquinas	3	52	3.91
Regulación positiva de la secreción de proteínas	3	53	3.86
Regulación de la Secreción	9	9	3.86
Quimiotaxis celular	4	89	3.80
Secreción por célula	11	469	3.63

Las categorías enumeradas consistían en un mínimo de 6 genes, tenían al menos 3 genes que habían cambiado y una puntuación Z de 0,3,63.  
doi:10.1371/journal.pone.0108034.t002

Tabla 3. Cambios en la Expresión Cerebral con CCI y mHW: Componente Celular.

Componente celular Puntuación Z positiva	# genes afectados	# en conjunto de genes	Puntuación Z
Borde en cepillo	3	62	3.60
Región extracelular	27	1766	3.16
Unión célula-célula	5	233	2.13
Puntuación Z negativa			
intracelular	59	10670	24.79
Parte intracelular	59	10453	24.52
orgánulo	50	8945	24.01
Organelo intracelular	50	8919	23.98
Núcleo	20	4806	23.78
Organelo delimitado por membrana	45	7998	23.62
Célula	105	14900	23.61
Parte de la célula	105	14900	23.61
Organelo delimitado por membrana intracelular	45	7982	23.60
Citoplasma	45	7841	23.43
Parte del orgánulo intracelular	45	3899	23.36
Organelo intracelular no delimitado por membrana	6	2328	23.33
Orgánulo no delimitado por membrana	6	2328	23.33
Parte del orgánulo	17	3978	23.27
Complejo macromolecular	14	3198	22.80
citoesqueleto	3	1408	22.72
complejo proteico	12	2670	22.46
citósol	4	1421	22.45
Parte citoplasmática	33	5320	22.19
parte nuclear	7	1714	22.11
Lumen encerrado en una membrana	7	1658	22.11

Las categorías enumeradas consistían en un mínimo de 6 genes, tenían al menos 3 genes que se cambiaron y una puntuación Z de  $\geq 2.0$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0108034.t003

Tabla 4. Cambios en la Expresión Cerebral con CCI y mHW: Función Molecular.

función molecular			
Puntuación Z positiva	# Genes afectados # en el conjunto de genes Z-Score		
Actividad de metil indol-3-acetato esterasa	3	7	12.01
Actividad de metil jasmonato esterasa	3	7	12.01
Actividad de esterasa de salicilato de metilo	3	7	12.01
Unión al receptor de neuropéptidos	3	21	6.65
Actividad hormonal	6	118	4.97
Actividad de carboxilesterasa	5	97	4.58
Actividad de hidrolasa de serina	7	203	4.00
Unión al receptor acoplado a proteína G	6	183	3.55
Actividad de peptidasa de tipo serina	6	200	3.28
Actividad de endopeptidasa de tipo serina	5	155	3.19
Actividad del transportador transmembrana de iones de sodio	3	80	2.80
Actividad de citoquinas	5	183	2.75
Actividad de aciltransferasa	5	193	2.61
Actividad transferace, transferencia de grupos acilo distintos de los grupos aminoacilo	5	193	2.61
Actividad del transportador transmembrana	14	835	2.59
Actividad del canal	8	388	2.58
Unión al receptor		999	2.58
Actividad del transportador transmembrana pasivo	8	389	2.57
Actividad de transferasa, transferencia de grupos acilo	5	198	2.54
Actividad del transportador		1026	2.47
Actividad del transportador transmembrana de cationes inorgánicos monovalentes	4	149	2.41
Actividad del transportador transmembrana de iones	11	654	2.30
Actividad del transportador transmembrana específico del sustrato	12	754	2.20
Actividad de canal específica del sustrato	7	376	2.11
Actividad transportadora específica del sustrato	13	863	2.09
Puntuación Z negativa			
Unión de nucleótidos de adenilo	4	1446	22.49
Unión de ribonucleótidos de adenilo	4	1439	22.48
Unión ATP	4	1414	22.44
Unión de nucleótidos	9	2096	22.26
Unión de ácido nucleico	12	2510	22.22
Unión de trifosfato de ribonucleósido de purina	7	1718	22.13
Vinculante	77	10525	22.03

Las categorías enumeradas consistían en un mínimo de 6 genes, tenían al menos 3 genes que se cambiaron y una puntuación Z de  $\geq 2.0$ .  
doi:10.1371/journal.pone.0108034.t004

lismo ImBPC se sembró en una microplaca Seahorse especializada (V7; área de crecimiento de 0,32 cm2) a 56104 células por pocillo en 100 ml de medio de cultivo y se incubó a 33uC en CO2 al 5% durante 2 h. Un Se agregaron 150 ml adicionales de medio después de que las células unido. Al día siguiente, se iniciaron los ensayos reemplazando los medios con XF-DMEM (complementado con glucosa 5 mM y piruvato de sodio 1 mM a pH 7,4) medios no tamponados y incubando a 37uC durante 60 min para permitir que la temperatura y el pH alcanzar el equilibrio. A continuación, la microplaca se colocó en el XF24 instrumento para medir OCR y ECAR. Mediciones basales de Se establecieron OCR y ECAR, y se inyectaron inhibidores de la respiración mitocondrial secuencialmente como se indicó para determinar la función mitocondrial y la glucólisis. los inhibidores se usaron a las siguientes concentraciones: oligomicina- 3 mM; cianuro de carbonilo 4-(trifluorometoxi)fenilhidrazona (FCCP)- 3 mM; rotenona- 3 mM; y antimicina A- 1,5 mM. atp

la producción se mide como (respiración basal – oligomicina respiración). La fuga de protones se mide como (respiración de oligomicina – respiración con rotenona/antimicina A). La respiración máxima es la respiración medida después del tratamiento con FCCP. La capacidad de reserva es medido como (respiración FCCP – respiración basal). La respiración no mitocondrial es la respiración que ocurre después tratamiento con rotenona/antimicina A.  
Los niveles de ATP en ImBPC se midieron usando un ATPlite ensayo de detección (Perkin Elmer; Waltham, MA) según protocolo del fabricante. Brevemente, las células se lisaron en varios momentos puntos en solución de lisis de células de mamífero seguido de incubación en solución de sustrato. Después de 10 min para adaptación a la oscuridad, luminiscencia se midió utilizando el lector de placas de etiquetas múltiples Victor3 (Perkin Elmer; Waltham, MA).

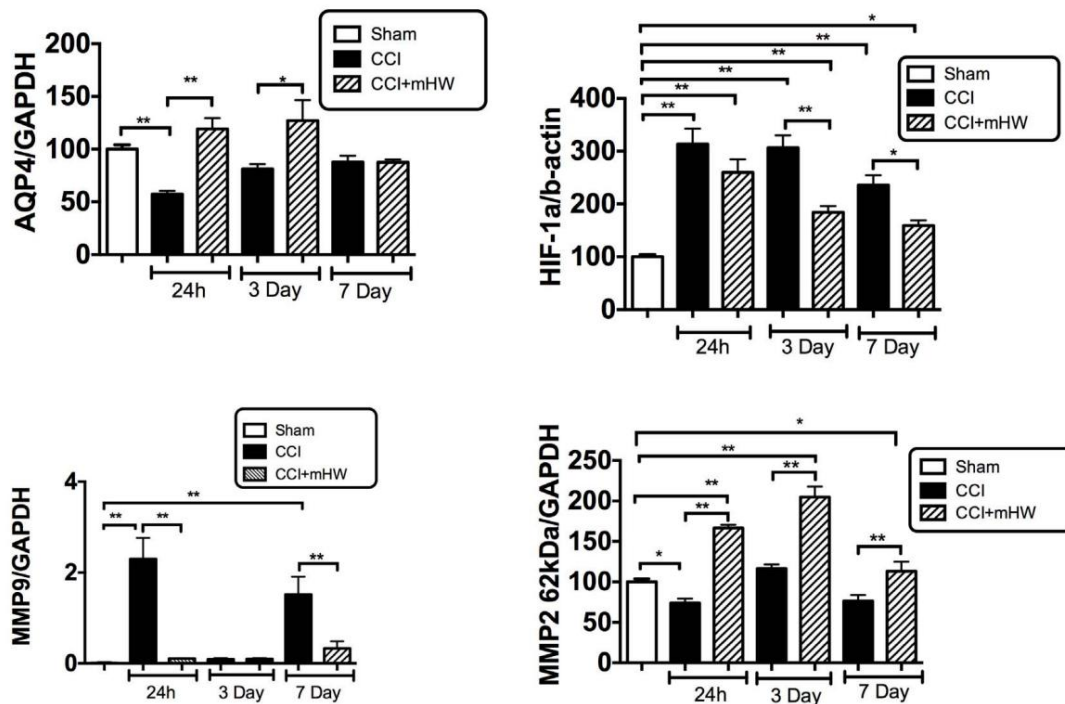


Figura 8. Efectos de CCI y mHW en los niveles de AQP-4, HIF-1 y MMP-2 y -9. El panel superior izquierdo muestra que CCI suprimió la expresión de AQP-4 a las 24 h y que mHW bloqueó esta disminución. HIF-1 (panel superior derecho) aumentó en todo momento después de que CCI y mHW indujeran una recuperación parcial. MMP-9 (panel inferior izquierdo) mostró elevaciones 24 h y 7 días después de CCI que fueron bloqueadas por mHW. MMP-2 disminuyó 24 h después de la CCI, pero mHW aumentó los niveles en todos los puntos de tiempo. doi:10.1371/journal.pone.0108034.g008

#### Análisis estadístico

Los resultados se informan en la media  $\pm$  2 el error estándar de la media. Se compararon dos medias mediante la prueba t de dos colas. Se compararon más de dos medias mediante análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba posterior de Newman-Keuls. Los estudios realizados con el XF24 Seahorse Analyzer se analizaron con el software AUC ANOVA proporcionado por Seahorse Bioscience.

#### Resultados

##### Edema cerebral

La Figura 1 muestra los resultados de la CCI y el tratamiento con mHW sobre el porcentaje de contenido de agua en el hemisferio ipsilateral. Un ANOVA de dos vías mostró significación estadística para el día [ $F(3,30) = 30,4$ ,  $p,0,001$ ], el tratamiento [ $F(1,30) = 11,2$ ,  $p,0,01$ ] y la interacción [ $F(1,30) = 5,9$ ,  $p,0,01$ ] para el % de agua. La prueba posterior de Tukey mostró que el % de agua aumentó significativamente 24 h después de la CCI ( $p, 0,001$ ), pero fue inhibido en un grado estadísticamente significativo por mHW ( $p, 0,001$ ). El análisis de los datos de 24 h usando el método Keep [11] mostró un edema significativo que fue revertido por mHW (recuadro).

##### Inmunohistoquímica e inmunotransferencia

La tinción de tau fosforilada con AT8 y Alz 50 aumentó considerablemente en la corteza de ratones CCI (Figuras 2 y 3) con extensión a la región CA3 del hipocampo (Figura 2). La tau total detectada con el anticuerpo pan-tau 17026 no se alteró 12, 18, 24 o 48 h después de la CCI (datos no mostrados). El tratamiento con mHW eliminó estos aumentos en tau (Figuras 2 y 3). CCI no produjo un aumento notable en la tinción de GFAP, pero los ratones CCI tratados con mHW tenían menos tinción de GFAP que los ratones simulados o CCI (Figura 4). CCI aumentó la inmunotinción de Iba1; mHW

disminuyó la inmunotinción de Iba1 a niveles más bajos que los observados en ratones falsos. (Figura 5).

##### Mediciones de citoquinas en suero y cerebro

Para el suero, solo el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) se vio significativamente afectado por la CCI en comparación con la cirugía simulada y solo a las 24 h (Figura 6); mHW no tuvo ningún efecto.

Debido a un efecto aparente de la cirugía simulada en los niveles de citoquinas cerebrales a las 4 h, se realizaron ANOVA separados para los resultados de 4 h, 24 h y 7 días. Tres citoquinas no fueron detectables en la muestra de cerebro (IL-9, eotaxina, INF-gamma). La Tabla 1 muestra los efectos de CCI y mHW en los niveles cerebrales de los otros 20 citocinas. Seis de las citocinas detectadas no se vieron afectadas por CCI (IL-2, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, TNF). De las 14 citoquinas restantes, todas tenían niveles cerebrales elevados en uno o más puntos de tiempo después de la CCI. Ocho estaban elevados en todos los puntos de tiempo (IL-1a, IL-4, IL-6, IL-12p40, G-CSF, MCP-1, MIP-1a, RANTES), cuatro a las 4 h y 24 h pero no a los 7 días (IL-1b, IL-12p70, KC, MIP-1b), 1 solo a las 4 h (GM-CSF) y uno a las 24 h y 7 días pero no a las 4 h (IL-3). Siete citoquinas tenían niveles de CCI+mHW en uno o más puntos de tiempo que diferían significativamente de los niveles de CCI (Tabla 1 y Figura 7). Excepto por el valor de 7 días de IL-1a, los valores de CCI+mHW fueron más altos que los de CCI solo. Estos aumentos fueron estadísticamente significativos a las 4 h y 24 h para IL-1a y MIP-1a ya las 4 h para IL-1b, G-CSF, KC y MIP1a (Figura 7). Para muchas citoquinas, el valor de CCI tendió a ser mayor a los 7 días que el valor de CCI+mHW, pero solo alcanzó significación estadística para IL-1a. Los niveles de TNF fueron más bajos en CCI+mHW que en ratones simulados 4 h después de CCI y los niveles de IL-13 fueron más altos en CCI+mHW que en ratones simulados 24 h después de CCI.



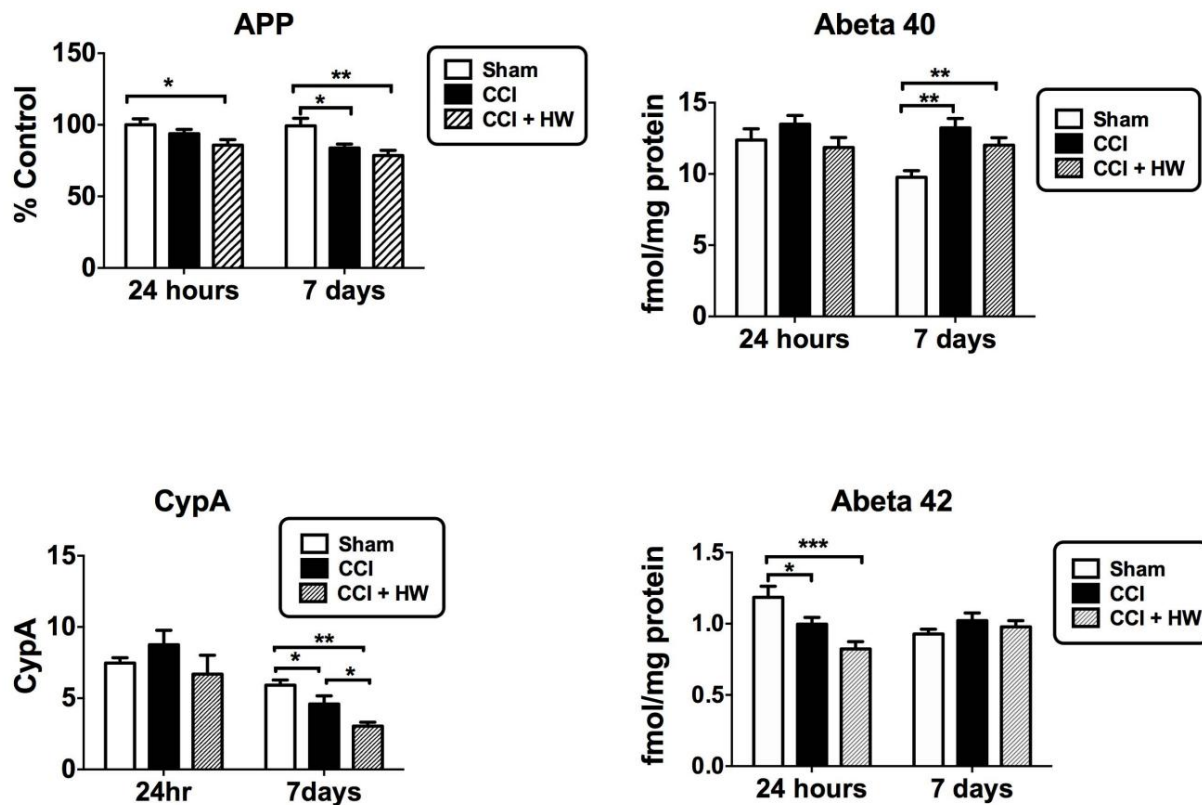


Figura 9. Efectos de CCI y mHW en los niveles de ciclofilina A, APP y péptido beta amiloide. El panel superior izquierdo muestra que los niveles de proteína de APP se redujeron 7 días después de la CCI y que mHW no protegió de la CCI. El péptido beta amiloide 1–40 (panel superior derecho) aumentó el día 7 y el péptido beta amiloide 1–42 (panel inferior derecho) disminuyó 24 h después de la CCI, pero mHW no alteró estos efectos de la CCI. CypA disminuyó 7 días después de la CCI y esta disminución se vio reforzada por mHW (panel inferior izquierdo). doi:10.1371/journal.pone.0108034.g009

#### estudios de ARNm

Después de la CCI, 246 genes habían aumentado la expresión en 2 veces o más y 38 genes tenían una expresión que se había reducido en un 50 % o más. mHW redujo en un 50% o más 236 genes cuya expresión se incrementó en 2 veces o más por CCI. Utilizamos GeneSifter para analizar qué categorías de Procesos biológicos (Tabla 2), Componentes celulares (Tabla 3) y Funciones moleculares (Tabla 4) se vieron más afectadas, restringiendo las categorías a aquellas que contenían un mínimo de 6 genes y que tenían al menos 3 genes alterados. El puntaje Z se usó como un filtro adicional con un valor absoluto de  $\geq 3.5$  para

Procesos Biológicos y  $\geq 2.0$  para Componentes Celulares y Funciones Moleculares. De 15 categorías significativas para procesos biológicos, todas las puntuaciones Z indicaron enriquecimiento positivo y categorías recurrentes relacionadas con la liberación de citoquinas (3 categorías), oxidación/metabolismo de carbohidratos (4 categorías) y migración/quimiotaxis de leucocitos o células (3 categorías). 8 categorías implicaban transporte/secreción y la mayoría se superponía con una categoría anterior (p. ej., transporte de citoquinas). Estos hallazgos sugieren que mHW es muy eficaz para revertir la activación de CCI de genes relacionados con la oxidación, el metabolismo de carbohidratos y la neuroinflamación. Las funciones moleculares que se enriquecieron positivamente incluyeron genes enzimáticos, genes receptores y genes transportadores, de canales y transportadores transmembrana. Molecular Functions se enriqueció negativamente en genes relacionados con ATP y unión de nucleótidos. Cellular Components se enriqueció positivamente en aquellos genes relacionados con el entorno extracelular y de la membrana celular y negativamente enriquecido en aquellos relacionados con los entornos intracelular, nuclear y citoplásmico.

#### AQP-4, HIF-1 y MMP-2 &- 9 Medidas AQP-4 se

suprimió 24 h después de la CCI pero se recuperó a la línea de base a los 3 días (Figura 8, panel superior izquierdo). El tratamiento con mHW indujo un aumento estadísticamente significativo en comparación con CCI a las 24 h y 3 días. HIF-1 aumentó significativamente por CCI en todos los puntos de tiempo, alcanzando un máximo a las 24 h; el tratamiento con mHW suprimió este aumento en un grado estadísticamente significativo en los días 3 y 7, aunque HIF-1 todavía estaba elevado en comparación con los ratones tratados con simulación (Figura 8, panel superior derecho). MMP-9 mostró un aumento bifásico, siendo elevado a las 24 h y a los 7 días pero no a los 3 días; mHW revirtió estos aumentos (Figura 8, panel inferior izquierdo). MMP-2 disminuyó 24 h después de CCI; mHW indujo un aumento estadísticamente significativo en MMP-2 en todos los puntos de tiempo en comparación tanto con el simulacro como con los grupos CCI de tiempo emparejado (Figura 8, panel inferior derecho).

#### Las medidas de ciclofilina A, APP y Ab CCI redujeron los

niveles de CypA 7 días pero no 24 h después de la CCI; mHW redujo aún más CypA a los 7 días después de la CCI (Figura 9, panel inferior izquierdo). Los niveles de proteína de APP se redujeron por CCI a los 7 días, pero no a las 24 h (Figura 9, panel superior izquierdo). El grupo CCI+mHW no difirió del grupo CCI en ningún momento, pero fue más bajo que los ratones simulados tanto a las 24 h como a los 7 días. Ab1–40 no se vio afectado a las 24 h, pero aumentó a los 7 días en los grupos CCI y CCI+mHW (Figura 9, panel superior derecho). Ab1–42 disminuyó 24 h después de CCI y CCI+mHW, pero no se alteró a los 7 días; no hubo diferencias en ningún momento para CCI frente a CCI+ mHW (Figura 9, panel inferior derecho). Las proporciones Ab1–42/Ab1–40

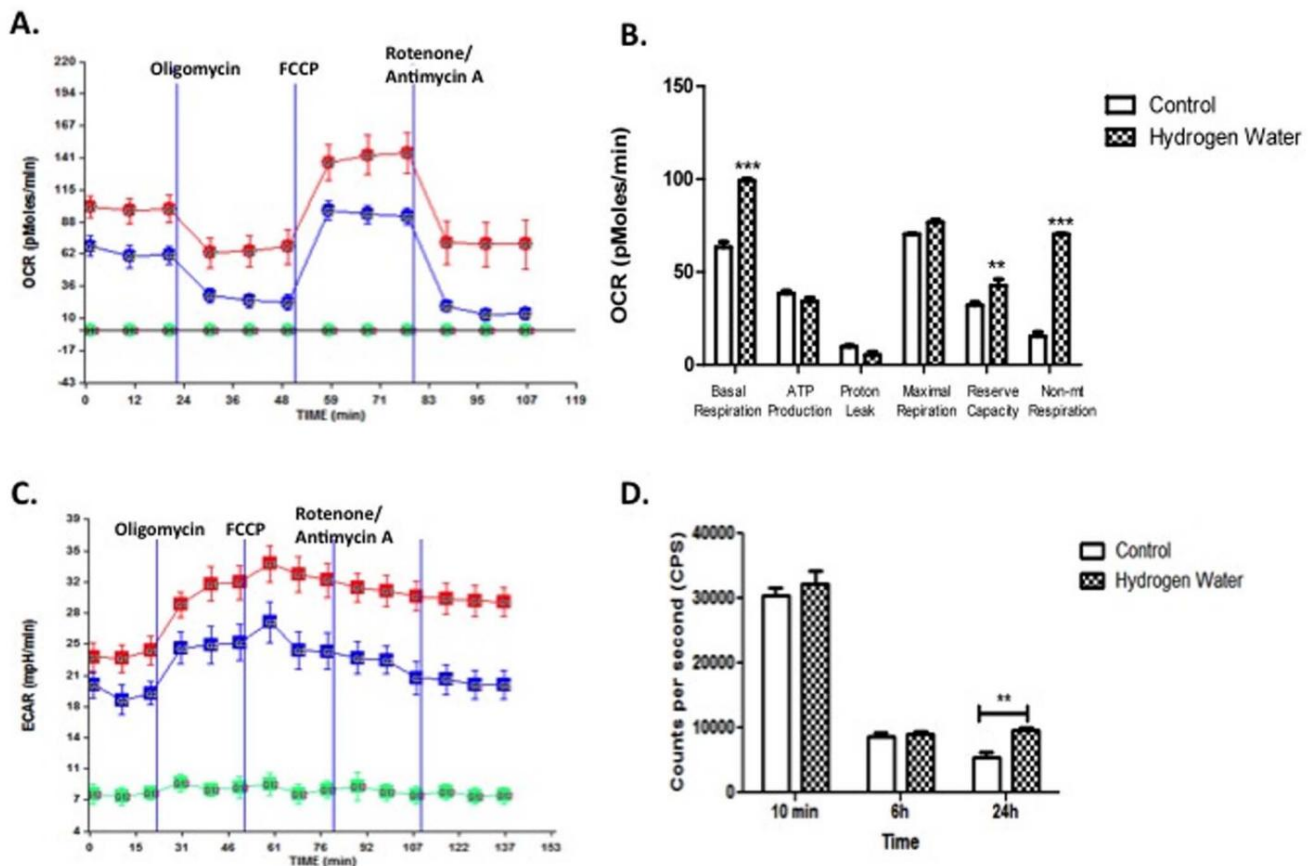


Figura 10. El pretratamiento con hidrógeno molecular mejora el metabolismo aeróbico mitocondrial. Las ImBPC se sometieron a una prueba de estrés mitocondrial después del tratamiento con agua de hidrógeno molecular (rojo) o control (agua dl; azul) durante 24 h. Tasas de consumo de oxígeno (OCR) (Panel A) y las tasas de acidificación extracelular (ECAR) (Panel C) se midieron con el analizador Seahorse XF24 en presencia del inhibidor de la ATP sintasa (oligomicina; 3 mM), el agente desacoplador (FCCP; 3 mM), el inhibidor del complejo I (rotenona; 3 mM) y el inhibidor del complejo III (antimicina A; 1,5 mM). El análisis de los datos de OCR mostró que el hidrógeno molecular aumentó la respiración basal, la capacidad de reserva y la respiración no mitocondrial (no mt), pero no tuvo efectos en la tasa de producción de ATP evaluada indirectamente por el análisis de OCR, la fuga de protones o la respiración máxima (Panel B). La medición directa de los niveles de ATP (Panel D) en otras células no expuestas a los estresores metabólicos mostró niveles más altos de ATP después de 24 h pero no después de 10 min o 6 h de exposición al hidrógeno molecular. Los resultados presentados aquí son de un experimento completado, que es representativo de los 3 experimentos que se realizaron. Los resultados se representan como una media de 6 SEM.

\*\* es  $p < 0,01$  y \*\*\* es  $p < 0,001$ . doi:10.1371/journal.pone.0108034.g010

fueron menores tanto a las 24 h como a los 7 días para los grupos CCI y CCI+mHW, pero no mostraron diferencias entre CCI y CCI+mHW (datos no mostrados).

#### Reabsorción de LCR y salida de Ab del cerebro a la sangre

Ni la reabsorción de LCR medida por la salida de I-albúmina ni la salida de Ab se vio afectada 24 h, 3 días o 7 días después de la CCI (datos no mostrados).

#### Efectos sobre la respiración celular

Para evaluar la función mitocondrial que se produce en respuesta a mHW, se realizó un ensayo de analizador Seahorse exponiendo el ImBPC pretratado con mHW a oligomicina, FCCP (carbonylcianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona) y rotenona/antimicina A en sucesión y midiendo OCR (Figura 10A) y ECR (Figura 10C). Los resultados mostraron que el hidrógeno molecular aumentó la respiración basal, la capacidad de reserva y la respiración no mitocondrial, pero no la respiración máxima, la fuga de protones o la producción de ATP dependiente del oxígeno (Figura 10B). La medida directa de ATP mostró niveles aumentados después de 24 h de exposición a mHW, pero no después de una exposición de 10 min o 6 h.

En otros ImBPC (Figura 11), el ETC se apagó antes de la exposición al hidrógeno molecular. OCR y ECAR no se vieron afectados por el hidrógeno molecular (Fig. 1 A–C) medido hasta por 6 h. Sin embargo, el hidrógeno molecular se asoció con un aumento en los niveles de ATP después de 6 h de exposición (Figura 11D).

#### Discusión

La TBI provoca lesiones a largo plazo en el SNC que implican efectos inmediatos, como edema cerebral, y efectos más sostenidos, como neuroinflamación. Aquí, encontramos que muchos de los efectos inmediatos y sostenidos fueron modulados al tratar ratones con mHW.

El edema es un punto final clínico significativo en la fisiopatología de la TBI. Ocurre debido a eventos continuos, incluida la interrupción de la BBB, y conduce a un mayor daño al cerebro por múltiples mecanismos que pueden incluir presión, alteraciones electrolíticas y las toxinas de la fuga de BBB. El edema alcanzó su punto máximo en nuestro punto de 24 h y el aumento aritmético observado en el tercer día (72 h después de la CCI) no fue estadísticamente significativo. mHW disminuyó el edema inducido por CCI en aproximadamente la mitad a las 24 h. El edema también se redujo según lo medido por el método Keep. Como el método Keep

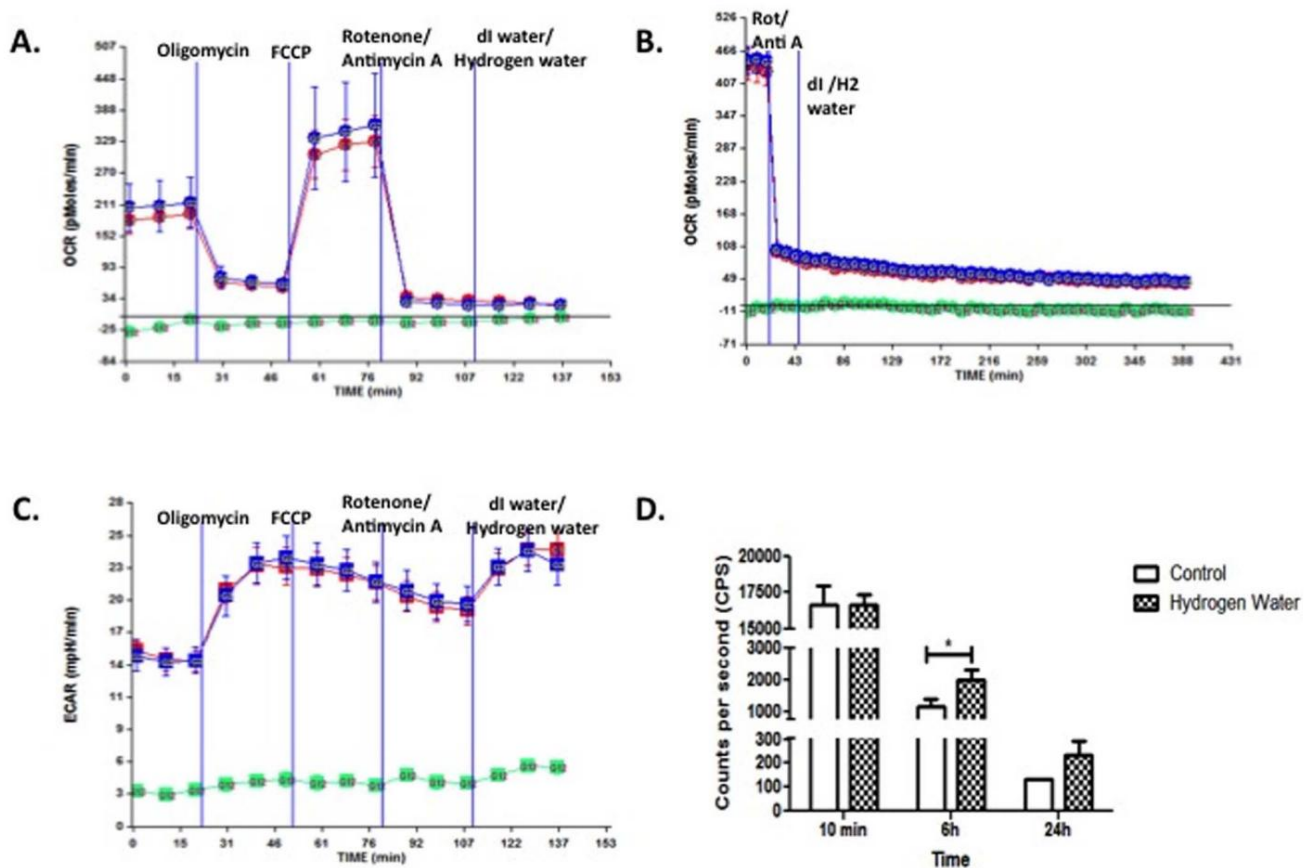


Figura 11. El tratamiento con hidrógeno molecular no recupera la respiración después de la inhibición de ETC. Las ImBPC se sometieron a una prueba de estrés mitocondrial en presencia del inhibidor de la ATP sintasa (oligomicina; 3 mM), el agente desacoplador (FCCP; 3 mM), el inhibidor del complejo I (rotenona; 3 mM) y el inhibidor del complejo III (antimicina A; 1,5 mM). Una vez inhibida la respiración, las ImBPC se expusieron a agua con hidrógeno (rojo) o control (dl agua; azul) y se midió la OCR durante 30 min (Panel A) o 6 h (Panel B). ECAR también se examinó durante 30 min (Panel C). Los niveles de ATP se midieron después de 10 min, 6 h o 24 h de tratamiento con agua de hidrógeno molecular. Los resultados presentados aquí son de un experimento completado, que es representativo de los 3 experimentos que se realizaron. Los resultados se representan como una media de 6 SEM. \*\* es  $p,0,01$  y \*\*\* es  $p,0,001$ . doi:10.1371/journal.pone.0108034.g011

utiliza el peso seco como denominador, está mucho menos influenciado por el edema o la pérdida de tejido que el método tradicional que utiliza peso húmedo en el denominador. Los resultados mostraron que el contenido de agua aumentó de ser 4 veces mayor que el peso seco a 6,5 veces mayor con CCI y que mHW conservó la proporción en 4,7 veces.

TBI, accidente cerebrovascular e hipoxia alteran las expresiones y funciones de AQP-4, HIF-1 y las MMP; estos, a su vez, afectan la formación de edema, la interrupción de la BHE y las alteraciones en las circulaciones del líquido intersticial cerebral [19]. La ciclofilina A se asocia con la interrupción de la BHE, especialmente en humanos o roedores transgénicos que son APOE4 positivos, a través de sus efectos sobre la MMP-9 [20,21]. CCI indujo cambios a las 24 h en AQP-4, HIF-1 y tanto MMP-2 como -9. Los cambios aún estaban presentes en comparación con las simulaciones en el día 7 para HIF-1 y MMP-9. Por el contrario, el efecto de la CCI sobre la ciclofilina A se retrasó, ocurriendo el día 7 pero sin efecto 24 h después de la CCI. Encontramos que mHW contrarrestó la inducida por CCI

perturbación de cada uno de estos factores. Estos efectos de mHW que contrarrestan las alteraciones inducidas por CCI para AQP-4, HIF-1, las MMP y la ciclofilina A proporcionan mecanismos mediante los cuales mHW puede proteger contra el edema y la alteración de la BHE.

Las alteraciones en AQP-4, que otros también han encontrado que está regulada negativamente en TBI, se han asociado con alteraciones en la eliminación de Ab a través de sus efectos sobre la circulación del líquido intersticial en el

cerebro. Nosotros, sin embargo, encontramos que ni la depuración de Ab del cerebro a la sangre ni la reabsorción de líquido cefalorraquídeo en la circulación fueron alterados por CCI en los puntos de tiempo examinados aquí. Aunque CCI afectó los niveles de proteína de APP y Ab, mHW no alteró los efectos de CCI.

El tratamiento con mHW bloqueó totalmente los cambios patológicos de tau fosforilada inducidos por CCI. Por el contrario, la tau total no se alteró a las 12, 18, 24 o 48 h después de la ICC. La TBI provoca una acumulación transitoria temprana de tau anormalmente fosforilada y la lesión repetida puede dar lugar a una encefalopatía traumática crónica que se clasifica como una tauopatía caracterizada por hiperfosforilación de tau y acumulación de tau patológica agregada o alterada conformacionalmente. Los cambios patológicos de tau también son un sello distintivo de la enfermedad de Alzheimer, lo que en última instancia da como resultado ovillos neurofibrilares, y es uno de los hallazgos que sugiere que la LCT y la enfermedad de Alzheimer pueden compartir mecanismos fisiopatológicos.

Aquí, encontramos elevaciones de tau fosforilada después de CCI en las regiones hipocámpica y cortical detectadas por AT8 y Alz50, pero no en tau total. El anticuerpo AT8 detecta tau que se fosforila en Ser202 y Thr205, un patrón de fosforilación típico de los ovillos neurofibrilares inmaduros de la enfermedad de Alzheimer. Alz50 también reconoce un patrón de fosforilación anterior al enredo similar al que se encuentra en la enfermedad de Alzheimer. Tratamiento con



mHW bloqueó totalmente la detección de estas formas de tau fosforilada inducidas por CCI.

Se cree que la neuroinflamación es un factor importante de la patología a largo plazo resultante de la TBI. Los agentes específicos de la inflamación, en particular las citocinas, probablemente desempeñen funciones tanto en la progresión como en la recuperación de la enfermedad. La neuroinflamación es un evento temprano en CCI como se ve aquí por elevaciones en citoquinas y genes relacionados con citoquinas. La inflamación periférica inducida por CCI evaluada por las citoquinas séricas fue, con la excepción de un aumento temprano en el G-CSF sérico, normal. Los impulsores inflamatorios, entonces, probablemente se centren en el SNC en lugar de eventos periféricos al cerebro. Esto no es sorprendente considerando que el modelo CCI de TBI inflige un daño significativo directamente al SNC, aunque es sorprendente dado que la neuroinflamación puede influir en el sistema inmunológico periférico. La tinción inmunohistoquímica sugirió que la CCI activaba la microglía, pero no los astrocitos.

La tinción mostró que la microglía se activó tanto en la corteza como en el hipocampo. El efecto de mHW fue profundo en la activación microglial inducida por CCI y pareció tener niveles reducidos de activación más bajos que los observados en ratones simulados, especialmente en la corteza.

De las 14 citocinas cuyos niveles aumentaron con CCI, 7 de ellas tenían niveles que se vieron afectados significativamente por mHW en uno o más puntos de tiempo. Sin embargo, mHW en su mayoría indujo un aumento adicional en los niveles de citocinas cerebrales, elevándolos incluso más que CCI solo. Esta desconexión entre el efecto de mHW en la activación microglial detectada por la tinción de Iba1 y en los niveles de citocinas cerebrales sugiere que otro tipo de células es responsable de la producción de citocinas. Se sabe que tanto las células endoteliales del cerebro como los pericitos secretan citoquinas de manera constitutiva y en respuesta a estímulos neuroinmunes [22,23,24]. Además, la tasa de transporte de citocinas a través de la BBB podría aumentar, como se ha demostrado que ocurre en otros tipos de lesiones del SNC [25,26,27,28] o la CCI podría aumentar el tráfico de células inmunitarias hacia el SNC y su contribución al conjunto de citocinas del SNC [29]. Los resultados sugieren además, dados los efectos terapéuticos de mHW, que las 7 citoquinas que tuvieron mayores elevaciones con el tratamiento con mHW pueden desempeñar un papel terapéutico en la recuperación de TBI en lugar de un papel patológico en la progresión. Algunas citocinas, como el TNF [30], son notorias por ser beneficiosas o perjudiciales según la concentración y el contexto, y la TBI es una de esas afecciones en las que las citocinas desempeñan ambas funciones [8].

A pesar del efecto paradójico sobre los niveles de proteína de citoquinas cerebrales, los efectos de mHW fueron revertir los aumentos inducidos por CCI en la expresión de genes relacionados con citoquinas. El tratamiento con mHW afectó a los genes cuyas proteínas estaban activas en la superficie celular y tendían a no afectar a los genes activados inducidos por CCI que afectaban a los procesos intracelulares, nucleares o ATP y de nucleótidos. Los genes de superficie afectados fueron los que tendían a relacionarse con la liberación y secreción de citocinas, la oxidación y el metabolismo de carbohidratos, el tráfico de leucocitos y los receptores, canales y transportadores.

Trabajos recientes han demostrado que los pericitos cerebrales son fundamentales para proteger la BBB y la unidad neurovascular del estrés oxidativo, pero son muy sensibles al estrés oxidativo, especialmente inducido por la respiración mitocondrial [18,31,32].

El trabajo resumido en la Tabla 2 muestra que mHW invierte el

La alteración de la expresión génica inducida por CCI relacionada con la oxidación y el metabolismo de los carbohidratos y, como tal, los pericitos cerebrales son el tipo de célula lógica que se debe examinar al evaluar los efectos protectores de un antioxidante del SNC. La evaluación de la respiración celular mostró que la exposición de los pericitos cerebrales al hidrógeno molecular durante 24 h aumentó la respiración basal, la capacidad de reserva y la respiración no mitocondrial, donde la "respiración no mitocondrial" se define como el uso de oxígeno que se produce a pesar del cierre de la cadena de transporte de electrones (Figura 10). En las células no expuestas a los estresores metabólicos (Figura 10D), la producción de ATP evaluada por el consumo de oxígeno no aumentó, pero la medición directa de ATP mostró que sí, lo que nuevamente indica la producción de ATP independientemente del uso de oxígeno. En los pericitos en los que se inactivó la cadena de transporte de electrones (Figura 11), el hidrógeno molecular no tuvo efecto sobre el consumo de oxígeno o ECAR, pero se encontró que los niveles de ATP estaban elevados. Por lo tanto, el trabajo de las figuras 10 y 11 proporciona evidencia de que el hidrógeno molecular puede respaldar la producción de ATP independientemente de la cadena de transporte de electrones. Proponemos que todos estos hallazgos pueden explicarse por la reacción de Jagendorf, definida como la producción de ATP que resulta de una desigualdad de actividad electroquímica de iones de hidrógeno que se ha producido independientemente de la cadena de transporte de electrones [33]. En circunstancias normales, la cadena de transporte de electrones establece el gradiente de protones y el gradiente da como resultado la producción de ATP. Jagendorf, sin embargo, demostró que la cadena de transporte de electrones podía pasarse por alto y producir ATP independientemente de ella estableciendo el gradiente de hidrógeno con un entorno ácido. Proponemos que el hidrógeno molecular también puede estar produciendo un gradiente de hidrógeno, promoviendo así la producción de ATP mitocondrial independientemente de la actividad de la cadena de transporte de electrones. Por lo tanto, el hidrógeno molecular puede estar trabajando en parte al superar el déficit de ATP que experimentan las células que sufren una TBI y, por lo tanto, tienen daño mitocondrial [34].

En general, estos estudios proporcionan una prueba de principio de que mHW puede revertir, bloquear o atenuar de manera potente muchos de los efectos de la CCI. Estos incluyen efectos sobre la formación de edema, patología tau, reguladores de las funciones de fluidos y BBB, neuroinflamación y expresión génica. Estos estudios se limitaron a que no evaluaron el tratamiento con mHW sin una fase de pretratamiento, pero sugieren que mHW podría ser un tratamiento importante y no tóxico para la LCT aguda. Debido a su no toxicidad y facilidad de administración, mHW podría adaptarse fácilmente para uso clínico, de emergencia e incluso de primeros respondedores.

## Expresiones de gratitud

Agradecemos a Peter Davies por la generosa donación del anticuerpo Alz-50.

## Contribuciones de autor

Concibió y diseñó los experimentos: KD BCK MAE AK GNS NS TS WAB. Realizó los experimentos: KD BCK MAE PJM AK ZF KMH GNS TS. Analizó los datos: KD BCK PJM AK ZF KMH NS TS WAB.

Reactivos/materiales/herramientas de análisis aportados: NS BCK WAB. Contribuyó a la redacción del manuscrito: KD BCK MAE PJM AK ZF KMH GNS NS TS WAB.

## Referencias

- Sayer NA (2012) Lesión cerebral traumática y sus secuelas neuropsiquiátricas en veteranos de guerra. *Annu Rev Med* 63: 405–419.
- Wick JY (2012) Lesión cerebral traumática: problema especial, atención especial. *Consultar Farmacia* 27: 392–399.
- Cernak I (2005) Modelos animales de traumatismo craneoencefálico. *NervioRx* 2: 410–422.
- Bazarian JJ, Cernak I, Noble-Haesslein L, Potoicchio S, Temkin N (2009) Resultados neurológicos a largo plazo después de una lesión cerebral traumática. *J Head Trauma Rehabil* 24: 439–451.
- Deng Y, Thompson BM, GAo X, Hall ED (2007) Relación temporal del daño oxidativo inducido por peroxinitrito, degradación del citoesqueleto mediada por calpaína y neurodegeneración después de una lesión cerebral traumática. *Neurología Experimental* 205: 154–165.
- Hawkins BE, Krishnamurthy S, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Prough DS, et al. (2013) Acumulación rápida de oligómeros de tau endógenos en un modelo de rata de lesión cerebral traumática: posible vínculo entre TBI y tauopatías esporádicas. *J Biol Chem*.

7. Johnson VE, Stewart W, Smith DH (2012) Patología generalizada de tau y beta amiloide muchos años después de una sola lesión cerebral traumática en humanos. *Brain Pathol* 22: 142–149.
8. Morganti-Kossmann MC, Lenzlinger PM, Hans V, Stahl P, Csuka E, et al. (1997) Producción de citocinas después de una lesión cerebral: beneficiosas y perjudiciales para el tejido dañado. *Psiquiatría molecular* 2: 133–136.
9. 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. *Medicina natural* 13: 688–694.
10. Miyamoto K, Tsumuraya T, Ohtaki H, Dohi K, Satoh K, et al. (2014) PACAP38 suprime el daño cortical en ratones con lesión cerebral traumática al mejorar la actividad antioxidante. *J Mol Neurosci* epub.
11. Mantenga RF, Hua Y, Xi G (2012) Contenido de agua cerebral. un malentendido ¿medición? *Transl Stroke Res* 3: 263–265.
12. Ishihara T, Hong M, Zhang B, Nakagawa Y, Lee MK, et al. (1999) Aparición y progresión dependientes de la edad de una tauopatía en ratones transgénicos que sobreexpresan la isoforma tau humana más corta. *Neurona* 24: 751–762.
13. Guthrie CR, Schellenberg GD, Kraemer BC (2009) SUT-2 potencia la neurotoxicidad inducida por tau en *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet* 18: 1825–1838.
14. Erickson MA, Niehoff ML, Farr SA, Morley JE, Dillman LA, et al. (2012) La administración periférica de oligonucleótidos antisentido dirigidos al precursor de la proteína beta amiloide revierte la sobreexpresión de ABPP y LRP-1 en el cerebro de ratón SAMP8 envejecido. *J Alzheimer's Dis* 28: 951–960.
15. Silverberg GD, Messier AA, Miller MC, Machan JT, Majumdar SS, et al. (2010) La expresión del transportador de salida de amiloide en la barrera hematoencefálica disminuye con el envejecimiento normal. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 1034–1043.
16. De Gasperi R, Gama Sosa MA, Kim SH, Steele JW, Shaughnessy MC, et al. (2012) La lesión por explosión aguda reduce la abeta cerebral en dos especies de roedores. *Front Neurol* 3: 177.
17. Banks WA, Fasold MB, Kastin AJ (1997) Medición de la tasa de salida del cerebro a la sangre. En: Irvine GB, Williams CH, editores. *Métodos en Biología Molecular: Protocolos de Neuropeptidos*. Totowa, Nueva Jersey: Humana Press. 353–360.
18. Shah GN, Price TO, Banks WA, Morofuji Y, Kovac A, et al. (2012) La inhibición farmacológica de las anhidrasas carbónicas mitocondriales protege a los pericitos cerebrales de ratón del estrés oxidativo y la apoptosis inducidos por glucosa alta. *J Pharmacol Exp Therap* 344: 637–645.
19. Higashida T, Kreipke CW, Rafols JA, Peng C, Schafer S, et al. (2011) El papel del factor 1 alfa inducible por hipoxia, la acuaporina 4 y la metaloproteína de matriz 9 en la alteración de la barrera hematoencefálica y el edema cerebral después de una lesión cerebral traumática. *J Neurosurg* 114: 92–101.
20. Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, et al. (2012) La apolipoproteína E controla la integridad cerebrovascular a través de la ciclofilina A. *Nature* 485: 512–516.
21. Halliday MR, Pomara N, Sagare AP, Mack WJ, Frangione B, et al. (2013) Relación entre los niveles de ciclofilina A y la actividad de la metaloproteína 9 de la matriz en el líquido cefalorraquídeo de portadores de apolipoproteína E4 cognitivamente normales y la ruptura de la barrera hematoencefálica. *JAMA* 70: 1198–1200.
22. Reyes TM, Fabry Z, Coe CL (1999) Producción de células endoteliales cerebrales de una citocina neuroprotectora, interleucina-6, en respuesta a estímulos nocivos. *Investigación del cerebro* 851: 215–220.
23. Verma S, Nakaoka R, Dohgu S, Banks WA (2006) Liberación de citoquinas por las células endoteliales del cerebro: una respuesta polarizada al lipopolisacárido. *Cerebro, comportamiento e inmunidad* 20: 449–455.
24. Kovac A, Erickson MA, Banks WA (2011) Los pericitos microvasculares cerebrales son inmunoreactivos en cultivo: expresión de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico y LRP-1 en respuesta a lipopolisacáridos. *Revista de neuroinflamación* 8: 139.
25. Pan W, Banks WA, Kennedy MK, Gutierrez EG, Kastin AJ (1996) Permeabilidad diferencial de la BBB en la EAE aguda: transporte mejorado de TNF-alfa. *Revista estadounidense de fisiología* 271: E636–E642.
26. Pan W, Kastin AJ (2001) El aumento en el transporte de TNF alfa después de una SCI es específico para el tiempo, la región y el tipo de lesión. *Neurología Experimental* 170: 357–363.
27. Pan W, Banks WA, Kastin AJ (1998) Permeabilidad de la barrera hematoencefálica a neurotrofinas. *Investigación del cerebro* 788: 87–94.
28. Pan W, Cain C, Yu Y, Kastin AJ (2006) El transporte de LIF mediado por receptores a través de la barrera hematoencefálica de la médula espinal aumenta después de una lesión de la médula espinal. *Revista de Neuroinmunología* 174: 119–125.
29. Jin X, Ishii H, Bai Z, Itokazu T, Yamashita T (2012) Cambios temporales en la expresión del marcador celular y la infiltración celular en un modelo de impacto cortical controlado en ratones C57BL/6 macho adultos. *PLoS One* 7: e41892.
30. Pan W, Zadina JE, Harlan RE, Weber JT, Banks WA, et al. (1997) Factor de necrosis tumoral alfa: un neuromodulador en el SNC. *Revisiones de neurociencia y biocomportamiento* 21: 603–613.
31. Price TO, Eranki V, Banks WA, Ercal N, Shah GN (2012) El tratamiento con topiramato protege a los pericitos de la barrera hematoencefálica del daño oxidativo inducido por hiperglucemia en ratones diabéticos. *Endocrinología* 153: 362–372.
32. Shah GN, Price TO, Banks WA, Morofuji Y, Kovac A, et al. (2013) La inhibición farmacológica de las anhidrasas carbónicas mitocondriales protege a los pericitos cerebrales de ratón del estrés oxidativo inducido por glucosa alta y la apoptosis. *J Pharmacol Exp Therap* 344: 637–645.
33. Jagendorf AT, Uribe E (1966) Formación de ATP causada por la transición ácido-base de los cloroplastos de espinaca. *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 170–177.
34. Soustiel JF, Larisch S (2010) Daño mitocondrial: un objetivo para nuevos horizontes terapéuticos. *Neuroterapéutica* 7: 13–21.