

PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL AGUA REDUCIDA POR ELECTRÓLISIS Y DEL HIDRÓGENO

Eréndira G Pérez-Hernández
José Pedraza-Chaverri

RESUMEN

El daño oxidante se define como el daño biomolecular causado por el ataque de las especies reactivas sobre los constituyentes de los organismos vivos. Este daño se ha asociado a la patogénesis de muchas enfermedades como Alzheimer, cáncer, diabetes, aterosclerosis y daño por isquemia-reperusión, entre otras. De esta forma el empleo de antioxidantes para prevenir el daño ocasionado por el estrés oxidante es de gran importancia. Se ha demostrado que el agua reducida por electrólisis (ERW, de sus siglas en inglés) atenúa el estrés oxidante y el daño asociado a diversas patologías experimentales (e.g. diabetes y daño hepático) en pacientes sometidos a hemodiálisis. El ERW se caracteriza por altas concentraciones de hidrógeno disuelto, bajas concentraciones de oxígeno disuelto, pH alcalino y un potencial de óxido reducción negativo. Tiene la capacidad de atrapar las siguientes especies reactivas: peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, anión superóxido y radical hidroxilo. Las propiedades antioxidantes del ERW se le han atribuido al hidrógeno disuelto en la misma. De hecho, se han demostrado las propiedades antioxidantes y citoprotectoras del hidrógeno gaseoso o disuelto en soluciones acuosas en varios modelos experimentales (e.g. Alzheimer, Parkinson, reacciones de hipersensibilidad, rechazo al trasplante, aterosclerosis y daño hepático, renal, intestinal, pulmonar, cardíaco, neuronal, cognitivo y de la columna vertebral) y en pacientes con diabetes y síndrome metabólico. En estudios in vitro y en cultivos celulares se ha encontrado que el hidrógeno reduce selectivamente al radical hidroxilo y al anión peroxinitrito, que se encuentran entre las especies reactivas más citotóxicas. Las evidencias anteriores sugieren que el hidrógeno es otro gas con potencial terapéutico.

Palabras Clave: *agua reducida por electrólisis, estrés oxidante, actividad antioxidante del hidrógeno, radical hidroxilo, especies reactivas de oxígeno.*

Antioxidant properties of electrolyzed reduced water and hydrogen

ABSTRACT

Oxidative damage is defined as the bimolecular damage caused by the attack of reactive species upon the constituents of living organisms. This damage is associated to many degenerative diseases such as Alzheimer, cancer, diabetes, atherosclerosis and damage by ischemia and reperfusion. In this context the use of antioxidants may be useful to prevent the damage induced by oxidative damage. It has been shown that electrolyzed reduced water (ERW) ameliorates oxidant stress and the damage induced in several experimental models (e.g. diabetes and hepatic damage) and in patients under hemodialysis. ERW is characterized by high concentrations of dissolved hydrogen, low concentrations of oxygen, alkaline pH and a negative redox potential. ERW is able to scavenge the following reactive species: hydrogen peroxide, hypochlorous acid, superoxide anion, and hydroxyl radical. It has postulated that the antioxidant properties of ERW are due to the hydrogen dissolve in it. In fact, it has been shown the antioxidant and cytoprotective properties of hydrogen gas or dissolved in aqueous solutions in several experimental models (e.g. Alzheimer, Parkinson, hypersensitivity reactions, transplant rejection, and damage to liver, intestine, lung, heart, and neurons) and in patients with diabetes and metabolic syndrome. It has been found In in vitro and in cell culture studies that hydrogen selectively scavenges hydroxyl radical and peroxynitrite anion, which are among the most cytotoxic reactive species. The data suggest that hydrogen may be considered as another gas with therapeutic potential.

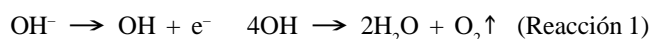
Key Words: *electrolyzed reduced water, oxidant stress, antioxidant activity of hydrogen, hydroxyl radical, reactive oxygen species.*

ARTÍCULO RECIBIDO EL 25 DE AGOSTO DEL 2010 Y ACEPTADO EL 14 DE DICIEMBRE DEL 2010.

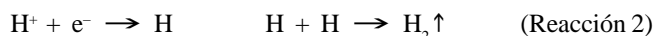
1. PRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL AGUA REDUCIDA POR ELECTRÓLISIS

La electrólisis consiste en la separación de los elementos que forman un compuesto aplicando electricidad. Durante este proceso ocurren reacciones de óxido-reducción; la reducción ocurre en el cátodo y la oxidación en el ánodo. A pesar de la estabilidad de la molécula del agua, es posible electrolizarla produciendo iones hidroxilo (OH^-) y protones (H^+), los cuales migran al ánodo y al cátodo, respectivamente¹. En el ánodo los OH^- pierden electrones para formar OH , los cuales resultan en la producción de H_2O y O_2 (reacción 1) y en el cátodo, los protones ganan electrones para convertirse en hidrógeno atómico (H) que resulta en la producción de H_2 (reacción 2).

Ánodo:



Cátodo:



Como resultado de la electrólisis del agua se produce agua alcalina catódica (abundante en hidrógeno disuelto) y agua ácida anódica (abundante en oxígeno disuelto). Esta última se usa ampliamente como antiséptico^{2,3} y se ha demostrado que acelera el proceso de cicatrización en la piel de rata⁴.

El agua reducida por electrólisis (ERW, por sus siglas en inglés) puede definirse como agua reductora¹ y tiene ciertas características físico-químicas particulares entre las que se encuentran las siguientes: pH alcalino (de 8 a 12), potencial de óxido-reducción negativo (de -100 a 900 mV), baja concentración de oxígeno disuelto (de 4.3 a 3.3 mg/L) y alta concentración de hidrógeno disuelto (de 0.2 a 0.55 mg/L, aproximadamente 200 a 500 veces más que el presente en el agua antes de la electrólisis)⁵. El ERW posee actividad parecida a las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa (SOD)⁶, atrapa a las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁷⁻⁹, ácido hipocloroso (HOCl)¹⁰ y anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)^{7,8} y protege al ácido desoxirribonucleico (ADN)^{6,8}, al ácido ribonucleico (ARN), a las proteínas¹¹ y a los lípidos¹⁰⁻¹² del daño oxidante. También se ha encontrado que el ERW potencia la actividad de dismutación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ del ácido ascórbico^{11,13}. En estudios efectuados para analizar la estabilidad de la actividad de atrapamiento presente en el ERW se demostró que dicha actividad es estable por un mes a 4°C y no se pierde a pesar de su neutralización, de congelamientos repetidos, de deflación con sonicación, de mezclado vigoroso, de filtraciones repetidas o esterilización en autoclave cerrada en presencia del trióxido de tungsteno⁶. Sin embargo, la actividad de atrapamiento se pierde cuando el agua reducida se somete a autoclave en un recipiente abierto. Por lo anterior Shirahata et al.⁶ propusieron que debido a que es volátil, el hidrógeno atómico es la sustancia responsable

del atrapamiento en el ERW. Hiraoka et al.¹⁴ demostraron que la actividad antioxidante de distintas muestras de ERW (muestras comerciales o agua preparada por los mismos autores) disminuía con el tiempo debido a la evaporación del hidrógeno. Por medio de resonancia magnética nuclear (absorción de ^{17}O) se demostró que el tamaño de los agregados de moléculas de agua es menor lo cual le confiere mayor habilidad de penetración⁷. En el cuadro I, se presenta una lista de las especies reactivas que son atrapadas por el ERW.

Especie	Referencia
H_2O_2	Hanaoka et al. ¹³ ; Tsai et al. ⁷ ; Ye et al. ⁹
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Hanaoka et al. ⁸ ; Tsai et al. ⁷
$\cdot\text{OH}$	Tsai et al. ⁷
HOCl	Huang et al. ¹⁰

Cuadro I. Especies reactivas que son atrapadas por el agua reducida por electrólisis.

2. EFECTO DEL ERW EN MODELOS EXPERIMENTALES Y EN PACIENTES

Las ROS son responsables del daño oxidante, el cual está estrechamente relacionado a distintas enfermedades crónicas e inflamatorias por lo que se han empleado antioxidantes para prevenir o tratar diversas patologías¹⁵. Actualmente, el ERW se utiliza ampliamente por las personas en el este de Asia para el tratamiento de diversas enfermedades¹⁶. Al respecto, distintas compañías Japonesas como Nihom Trim (Osaka), Water Institute (Atarashii Mizuno Kai, Tokyo) y otras han desarrollado y vendido ERW, como agua de consumo diario. A continuación se revisan las evidencias sobre las propiedades antioxidantes del ERW y del hidrógeno.

Diabetes

Las ROS están implicadas en las complicaciones metabólicas de la diabetes. Por lo que se ha reconocido que el atrapamiento de ROS es de gran importancia para el control de la diabetes. Se ha demostrado que el uso de ERW en modelos animales con diabetes disminuye los niveles de glucosa¹⁷⁻¹⁹ así como los niveles de colesterol y de triglicéridos¹⁷. Interesantemente, el uso de ERW aumentó los niveles de insulina en los ratones genéticamente modificados (C57BL/6J db/db) pero no en los ratones con diabetes inducida por estreptozotocina¹⁸. Además, el ERW mejoró la tolerancia a la glucosa^{18,19} y preservó la masa de células β ¹⁹.

Daño de células pancreáticas

Li et al.²⁰ demostraron que el ERW previene las siguientes alteraciones inducidas por aloxano en la línea de células β de páncreas de hámster (HIT-T15): generación de ROS, incremento en la concentración de Ca^{2+} libre citosólico, fragmentación de ADN, disminución en el nivel de ATP intracelular y la disminución de la secreción de insulina inducida por glucosa.

Estudios en líneas celulares de distintos tipos de cáncer

Se evaluó la actividad del ERW en distintas líneas celulares y etapas de la carcinogénesis. Nishikawa et al.²¹ encontraron que el ERW suplementada con nanopartículas de platino previene la transformación de las células Balb/c 3T3 inducida por 3-metilcolantreno y forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), mientras que Ye et al.⁹ observaron que el ERW atenuó la liberación de H₂O₂ y disminuyó la transcripción del gen para el factor del crecimiento del endotelio-vascular (VEGF) y la secreción de esta proteína a través de la inactivación de señales extracelulares reguladas por cinasas (ERK) en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A-549. Estos resultados tienen implicaciones importantes en el proceso de angiogénesis, el cual es el responsable del 80% al 90% de las muertes en pacientes con cáncer. Tsai et al.⁷ encontraron en la línea celular de leucemia HL-60 que el ERW potenció la apoptosis mediada por el tripéptido antioxidante glutatión lo que se asoció a la regulación a la baja de la proteína antiapoptótica Bcl2 y a la translocación de la proteína proapoptótica Bax. Este efecto fue selectivo para las células HL-60 pues no se observó en las células polimofonucleares obtenidas de sangre periférica⁷. Finalmente, Lee et al.²² observaron que la administración de ERW causó retraso en el crecimiento del tumor, disminución de la metástasis y en la cantidad de ROS cuando se inoculó la línea celular de melanoma B16 a ratones C57BL/6. Lo anterior ha conducido a proponer que el tratamiento con ERW podría tener efectos antitumorales.

Daño hepático

También se han observado los efectos hepatoprotectores del ERW. Tsai et al.²³ emplearon el modelo de daño hepático inducido con tetracloruro de carbono (CCl₄) y observaron que el tratamiento con ERW disminuyó los niveles en suero de alanina aminotransferasa e incrementó las actividades de SOD, catalasa y glutatión peroxidasa en hígado. Mientras que Park et al.¹⁶ encontraron en un modelo de daño ocasionado por etanol que el consumo de ERW incrementó los niveles de alcohol deshidrogenasa tipo I y de acetaldehído deshidrogenasa en el tejido hepático. En el suero, disminuyeron los niveles de aspartato aminotransferasa y de alanina aminotransferasa. Este efecto protector se asoció al aumento de glutatión y de enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa, glutatión S transferasa, SOD y catalasa) en el tejido hepático. Estos resultados demuestran que el ERW favorece la detoxificación del etanol por mecanismos antioxidantes.

Pacientes con enfermedad renal sometidos a hemodiálisis

Ya que la hemodiálisis produce ROS en la sangre, se empleó el ERW en el dializado y se observó una disminución del H₂O₂ y del HOCl y en los marcadores de estrés oxidantes e inflamatorios (Proteína C reactiva e IL-6), minimizó la aterosclerosis y mejoró la anemia severa durante el tratamiento^{10,12}. En distintos estudios se ha descrito que el empleo del ERW para efectuar la diálisis tiene efecto en el sistema inmune. Nakayama et al.^{24,25} demostraron que el ERW tiene menor capacidad oxidante que el agua no

reducida. El tratamiento con ERW en pacientes con enfermedad renal en estadio terminal, disminuyó la apoptosis de los linfocitos T y alteró los marcadores de superficie relacionados a CD25 y el perfil de citocinas aproximándolos a sus niveles normales²⁶. En el cuadro II se hace una lista de los estudios del ERW realizados en modelos experimentales y en pacientes.

Estudio	Referencia
Diabetes Tipo I. Ratones diabéticos genéticamente modificados C57BL/6J db/db (db/db). Tipo II. Ratones inyectados con estreptozotocina (STZ). Tipo II. Ratas OLETF	Kim & Kim ¹⁸ Kim et al. ¹⁹ Jin et al. ¹⁷
Daño en células pancreáticas. Se produjo daño con aloxano en la línea celular β-pancreática de hámster (HIT-T15).	Li et al. ²⁰
Cáncer. Células Balb/c 3T3 transformadas con 3 metil colantreno y forbol 12-miristato-13-acetato. Línea celular de adenocarcinoma pulmonar A-549. Ratones C57BL/6 inoculados con la línea celular de melanoma B16. Línea celular de leucemia promielocítica HL-60	Nishikawa et al. ²¹ Ye et al. ⁹ Lee et al. ²² Tsai et al. ⁷
Daño hepático inducido por: Tetracloruro de carbono (CCl ₄) en ratones. Etanol en ratas Sprague Dawley	Tsai et al. ²³ Park et al. ¹⁶
Hemodiálisis. Pacientes con enfermedad renal en estadio terminal en tratamiento de hemodiálisis.	Huang et al. ^{10,12,26} ; Nakayama et al. ^{24,25}
OLETF= Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty.	

Cuadro II. Actividad protectora del agua reducida por electrólisis: estudios en modelos experimentales y en humanos.

3. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL HIDRÓGENO

El hidrógeno es el primer elemento de la tabla periódica y constituye cerca del 90% del universo. En la tierra, el hidrógeno libre es raro, puesto que la mayoría se encuentra en el agua y en compuestos orgánicos²⁷. Además, este elemento es permeable a las membranas celulares por lo que es capaz de llegar a organelos como el núcleo y la mitocondria²⁸. Ohsawa et al.²⁹ demostraron que el hidrógeno contrarresta al •OH (reacción 3), empleando pruebas fluorescentes y espectroscopia de resonancia magnética del espín del electrón.



Asimismo, por medio de pruebas fluorescentes demostraron que el hidrógeno también atrapa al peroxinitrito (ONOO⁻)²⁹. Lo anterior es de particular importancia ya que el •OH es la especie oxidante más fuerte y la cual reacciona indiscriminadamente con ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Adicionalmente, a diferencia de otros antioxidantes como la vitamina E y los polifenoles, el hidrógeno no produce moléculas oxidadas después de llevar a cabo la reducción^{10,12}. A pesar de lo antes mencionado, las células animales no producen hidrógeno ya que la actividad de hidrogenasa, responsable de la ruptura reversible del hidrógeno molecular (reacción 4) no se ha identificado y la producción espontánea de hidrógeno gaseoso en el cuerpo humano ocurre por la fermentación de carbohidratos no digeribles por la flora enterobacterial residente³⁰.



4. EFECTO DEL HIDRÓGENO EN MODELOS EXPERIMENTALES Y EN PACIENTES

En los últimos años se ha demostrado que el hidrógeno ejerce efectos benéficos en distintos modelos animales de un número de enfermedades asociadas a estrés oxidante. En los estudios efectuados se han empleado hidrógeno en forma de gas y disuelto en agua o en solución salina. El gas se administra por inhalación mientras que el hidrógeno en solución acuosa se administra por vía oral y en solución salina por vía intraperitoneal o intravenosa. Sin embargo, la aplicación clínica del gas hidrógeno no es tan conveniente debido a que es inflamable y explosivo, de hecho las concentraciones empleadas son menores del 4%, es decir, por debajo de la concentración a la cual este gas es inflamable (4.6%)³¹. Dada lo anterior, el empleo de una solución salina rica en hidrógeno o bien de agua rica en hidrógeno (0.8 a 1.6 mg/L) puede ser aplicada de manera más fácil y segura³².

Daño hepático

La administración intraperitoneal de una solución salina rica en hidrógeno (1.72 mg/L) atenuó el daño hepático inducido por el ligamiento del ducto biliar en estrecha asociación con la reducción de la inflamación, del estrés oxidante y la inhibición de la vía de señalización ERK1/2³². En un modelo de daño hepático causado por isquemia-reperfusión en ratones macho C57 BL/6N, se observó que la inhalación de hidrógeno (1 al 4%) disminuyó la muerte celular hepática y redujo los niveles de alanina aminotransferasa y de malondialdehído³³. En un modelo de inflamación crónica hepática asociada con *Schistosomiasis*, se observó que el tratamiento con hidrógeno gaseoso disminuyó la fibrosis, mejoró la hemodinámica, incrementó la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa y glutatión peroxidasa), disminuyó los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y los de lípidos peroxidados³⁴.

Daño renal

El cis-diaminodicloroplatino o cisplatino es uno de los fármacos antitumorales más potentes, por lo que es el tratamiento de elección para distintos tipos de cáncer. A pesar de esto uno de los principales efectos secundarios del cisplatino es su

nefrotoxicidad. Nakashima-Kamimura et al.³⁵ encontraron que la inhalación de hidrógeno (1%) y el tratamiento con agua rica en hidrógeno (1.2 mg/L) atenúan la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, así como la pérdida de peso, la mortalidad y el estrés oxidante. Estos resultados concuerdan con Kitamura et al.³⁶ quienes encontraron que el tratamiento de ratas con agua rica en hidrógeno (1.2 mg/L) mejoró la disfunción renal. En un modelo de daño renal por isquemia-reperfusión se observó que el tratamiento con una solución salina rica en hidrógeno (1.2 mg/L) indujo una disminución en la congestión intersticial, edema, inflamación y disminuyó la hemorragia renal³⁷.

Daño neuronal

Diversos estudios han descrito el efecto antioxidante del agua rica en hidrógeno en cerebro. Sato et al.³⁸ encontraron que el agua rica en hidrógeno disminuyó la producción de O₂^{•-} inducido por isquemia y perfusión en rebanadas de cerebro de los ratones knockout SMP30/GNL que son incapaces de sintetizar vitamina C.

La administración de hidrógeno gas (2%) y disuelto en solución salina después del daño cerebral ocasionado por hipoxia-isquemia neonatal indujo protección de la muerte neuronal por apoptosis, disminuyó la actividad de las caspasa 3 y 12, los niveles de malondialdehído (MDA) y la inflamación (proliferación de microglia)^{39,40}.

Ohsawa et al.²⁹ demostraron que el hidrógeno en forma de gas podría emplearse como antioxidante para neutralizar el estrés oxidante después del daño por isquemia-reperfusión. Para inducir las ROS, los autores tratan a las células PC12 con un inhibidor del complejo I y III de la cadena respiratoria mitocondrial o mediante privación de glucosa-oxígeno. Después del daño oxidante, las células sufrieron despolarización mitocondrial, depleción de ATP, oxidación de ADN, peroxidación de lípidos, necrosis celular y apoptosis. Interesantemente, cuando el hidrógeno se disolvió en el medio de cultivo, se encontró una disminución de los eventos antes citados y una mejoría en la viabilidad celular. Además, para probar la eficacia del empleo del hidrógeno gaseoso, Ohsawa et al.²⁹, emplearon el modelo de daño en rata de ligadura de la arteria media cerebral y perfusión. La inhalación de hidrógeno al 2% limitó el volumen de daño mientras fue administrado antes de la fase de perfusión. Este efecto fue comparable con lo observado cuando se empleó un fármaco inmunosupresor y neuroprotector (FK506) empleado en estudios preclínicos para el tratamiento del infarto cerebral. El tratamiento con hidrógeno además disminuyó los niveles de peroxidación de lípidos y la oxidación de ADN en el tejido cerebral.

Alzheimer

En el modelo en rata de la enfermedad de Alzheimer, el tratamiento con una solución salina rica en hidrógeno (inyección intracerebro ventricular, empleando una concentración de hidrógeno de 1.2 mg/L) previno la neuroinflamación (disminución en los niveles de IL-6 y de TNF- α) y el estrés oxidante [disminución en los

niveles de MDA y 4-hidroxinonenal (HNE)], ocasionadas por el péptido β -amiloide A β 1-42, lo cual mejoró la memoria y el aprendizaje⁴¹. Por lo anterior, los autores proponen que debido a la capacidad de la solución salina rica en hidrógeno de penetrar la barrera hemato encefálica puede ser de gran utilidad para tratar desordenes neurológicos como lo es esta enfermedad.

Parkinson

En la enfermedad de Parkinson la disfunción mitocondrial y el estrés oxidante asociado son las principales causas de la pérdida de las células dopaminérgicas en la sustancia negra⁴². En este contexto, Fu et al.⁴³ estudiaron el efecto de la administración oral de agua rica en hidrógeno (0.8 mg/L) en un modelo de la enfermedad de Parkinson en rata y encontraron que el hidrógeno previno el desarrollo y la progresión de la degeneración nigroestriatal, así como la pérdida de las células dopaminérgicas.

Daño cognitivo

Por otro lado Nagata et al.⁴⁴ observaron que la administración oral de agua rica en hidrógeno (1.2 mg/L) a ratones sometidos a inmovilización física crónica suprimió el aumento en los marcadores de estrés oxidante, HNE y MDA, y previno el deterioro cognitivo debidas a alteraciones inducidas por el estrés en las tareas de aprendizaje dependientes del hipocampo.

Daño a la columna vertebral

Mientras que en un modelo de daño a la columna vertebral la administración intraperitoneal de solución salina rica en hidrógeno disminuyó el número de células apoptóticas, disminuyó el estrés oxidante, mejoró la función locomotora e incrementó la liberación de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)⁴⁵.

Daño al miocardio

Empleando el modelo de daño al miocardio por isquemia reperfusión, se observó que la administración intraperitoneal de la solución salina rica en hidrógeno (1.2 mg/L) disminuyó la concentración de malondialdehído en plasma y miocardio, disminuyó la apoptosis de las células cardíacas y el daño al ADN debido a estrés oxidante. Además se encontró una disminución en hemorragia, isquemia y en el número de leucocitos dentro de la zona isquémica⁴⁶, lo cual concuerda con Hayashida et al.³⁰, quienes encontraron que la administración de hidrógeno en forma de gas (2%) redujo el tamaño de infarto sin alterar los parámetros hemodinámicos. Puesto que el hidrógeno se transfiere a la circulación portal y es excretado en el aliento en cantidades significantes, este grupo demostró que el hidrógeno inhalado a dosis terapéuticas no tuvo efectos adversos en los niveles de saturación del oxígeno arterial, en la frecuencia cardíaca, o en la presión del ventrículo izquierdo. Debido a que el corazón es uno de los órganos más perfundidos, la concentración intramiocárdica de hidrógeno incrementó inmediatamente después de la inhalación de hidrógeno hasta alcanzar niveles cercanos a los observados en la sangre arterial e interesantemente, la concentración de hidrógeno en el miocardio isquémico alcanzó las dos terceras partes del valor observado en el tejido sin daño. Por lo que el tratamiento con hidrógeno promete ser una estrategia

terapéutica útil para disminuir el daño ocasionado por isquemia-reperfusión³⁰.

Daño intestinal

El daño intestinal ocasionado por isquemia-reperfusión es un desorden clínico devastador y ocurre en distintos padecimientos, entre los que se encuentran el aneurisma de aorta abdominal y trasplante del intestino delgado. Entre las consecuencias del daño se encuentran alteración en la absorción intestinal, cambios en la flora intestinal microbiana y falla múltiple del intestino. En el modelo de daño al intestino por isquemia reperfusión, se encontró que la administración intravenosa de la solución salina rica en hidrógeno (1.2 mg/L) a ratas disminuyó el daño intestinal^{47,48}, la actividad de diamino oxidasa (DAO), el cual es un marcador de la integridad de la mucosa intestinal y la actividad de mieloperoxidasa (MPO), la cual se determinó para medir la ampliación de la infiltración de neutrófilos en el tejido intestinal⁴⁸. El incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 es otro proceso patofisiológico importante en la isquemia reperfusión, puesto que ocasiona infiltración de leucocitos al tejido dañado. En la lamina propia de la mucosa intestinal hay macrófagos, enterocitos y células de Paneth, las cuales son capaces de producir citocinas proinflamatorias. Adicionalmente Zheng et al.⁴⁸ indican que el tratamiento con una solución rica en hidrógeno disminuyó los niveles de estas citocinas, por lo que probablemente se atenúe la respuesta inflamatoria excesiva en el intestino. Chen et al.⁴⁷ demostraron que el tratamiento con solución salina rica en hidrógeno a ratas inhibió la apoptosis inducida por la isquemia reperfusión intestinal y promovió la proliferación de los enterocitos, los cuales son las principales células epiteliales presentes en el intestino y cuya función es la absorción de nutrimentos y fluidos digeridos. Además, limitó la infiltración de neutrófilos y la oxidación de lípidos, los cuales son los procesos patológicos representativos del daño por isquemia reperfusión. La administración de agua saturada con hidrógeno (1.56 mg/L) en la dieta diaria de ratones mejoró los síntomas clínicos y previno el desarrollo de colitis ocasionada por sulfato de sodio dextrán. Dicha protección se asoció a la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-12 y TNF- α) y a la disminución en la infiltración de macrófagos en las lesiones presentes en el colon⁴⁹.

Daño pulmonar

Muchos estudios han demostrado que la isquemia-reperfusión intestinal altera las barreras mucosas intestinales permitiendo la entrada de bacterias y endotoxinas en la circulación, lo cual resulta en una respuesta inflamatoria y en la disfunción de distintos órganos, incluyendo daño pulmonar. En este contexto, Mao et al.⁵⁰ encontraron que la administración intravenosa de solución salina rica en hidrógeno a ratas sometidas a daño por isquemia reperfusión intestinal, atenuó el daño ocasionado en el tejido pulmonar. Lo cual se asoció con la disminución de la infiltración de neutrófilos, de la peroxidación de lípidos de la membrana, de la activación de NF- κ B y de la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α).

Trasplantes

Dada la importancia que representan las ROS en el daño presente en los trasplantes, se han empleado diversos agentes antioxidantes para disminuir dicho daño⁵¹. A continuación se menciona el resultado del tratamiento con ERW en el trasplante de riñón e intestino. La isquemia en el intestino es la principal fuente de mediadores proinflamatorios que ocasionan no solo daño y disfunción intestinal sino también una respuesta inflamatoria sistémica que conlleva al daño de distintos órganos; de esta forma, el trasplante de intestino es la opción terapéutica para el tratamiento de pacientes con daño intestinal. En un modelo de trasplante de intestino, la administración perioperatoria del hidrógeno en forma gaseosa (2%) en ratas, mejoró el daño ocasionado en el donador y previno la respuesta inflamatoria sistémica en el receptor del órgano. El tratamiento con hidrógeno mejoró la motilidad intestinal, lo cual se asoció con una disminución en la expresión del mRNA para las citocinas proinflamatorias IL-1 β y la IL-6 y protegió la barrera mucosa⁵¹. La enfermedad crónica en riñón es una de las principales causas de muerte en Estados Unidos y el trasplante de este órgano es el tratamiento de elección. Sin embargo, la gran mayoría de anomalías se deben a la nefropatía crónica del injerto, la cual se caracteriza por una deterioración progresiva de la función renal manifestado por un incremento en la hipertensión renal y en la proteinuria. Distintos factores contribuyen al desarrollo de la nefropatía crónica del injerto, tal como factores inmunológicos (por ejemplo, rechazo agudo al trasplante) o factores no inmunológicos (por ejemplo, daño por isquemia reperfusión). Cardinal et al.³¹ demostraron que al administrar una dieta suplementada con agua rica en hidrógeno (1.2 mg/L) a ratas que habían sido sometidas a un trasplante de riñón, mejoró la función del riñón transplantado y la supervivencia al prevenir la nefropatía crónica al injerto. Estos resultados son explicados ya que por una parte la administración del ERW redujo el daño ocasionado por el estrés oxidante y además, disminuyó la activación de vías de señalización inflamatorias y la producción de citocinas.

Aterosclerosis

La aterosclerosis es una enfermedad asociada con la inflamación y con la producción de ROS. Para estudiar los efectos del hidrógeno en la aterosclerosis, Ohsawa et al.⁵² emplearon ratones *knockout* en apolipoproteína E. La alimentación con agua rica en hidrógeno (0.8 mg/L), durante seis meses, redujo las lesiones ateroscleróticas, producidas por la acumulación de macrófagos, y disminuyó el estrés oxidante (niveles de HNE) en aorta de ratones⁵¹. Por lo anterior se ha postulado que el consumo regular de agua rica en hidrógeno podría prevenir la aterosclerosis

Reacciones de hipersensibilidad

Las células cebadas son las células efectoras clave en la respuesta mediada por la inmunoglobulina E (IgE). El receptor de alta afinidad por IgE, Fc ϵ RI, se expresa en la superficie de las células cebadas, de manera que cuando un antígeno es reconocido por las moléculas IgE, esta última molécula se une a su receptor. La agregación de los receptores Fc ϵ RI y la activación de señales de

transducción resultan en la degranulación de la célula cebada y por tanto en la liberación de mediadores preformados, producción de citocinas y secreción de leucotrienos. En el estudio efectuado por Itoh et al.⁵³ se demostró que la alimentación con agua rica en hidrógeno (1.0 mg/L) atenuó la fosforilación de los receptores Fc ϵ RI asociados a Lyn, esto ocasionó una disminución en las señales de transducción, lo cual inhibió la actividad de la NADPH oxidasa y redujo la generación de H₂O₂. Además estos autores proponen que el tratamiento con hidrógeno podría emplearse para el tratamiento de enfermedades alérgicas como el asma bronquial, rinitis, conjuntivitis y la urticaria.

Diabetes

La frecuencia de diabetes mellitus tipo II ha aumentado alrededor del mundo y se está convirtiendo en un importante problema de salud pública en muchas partes del mundo. Kajiyama et al.⁵⁴, encontraron que la administración de agua rica en hidrógeno (1.2 mg/L) a pacientes resultó ser benéfica en la prevención de la diabetes tipo II y en la resistencia a insulina. Los autores observaron una disminución en los niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL), una tendencia en la disminución de LDL oxidada y de ácidos grasos libres en suero; además se incrementaron los niveles en plasma de adiponectina y SOD extracelular. Mientras que en 4 de 6 pacientes con intolerancia a la glucosa se normalizó la prueba de tolerancia a la glucosa.

Síndrome metabólico

El síndrome metabólico se caracteriza por una variedad de anomalías metabólicas y antropométricas, entre las que se encuentran un exceso de peso, hiperglicemia, hipertensión y bajas concentraciones de lipoproteína de alta densidad (HDL), por lo que las personas que padecen síndrome metabólico son más propensas a desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo II. El síndrome metabólico está estrechamente relacionado con los hábitos relacionados con el estilo de vida de la persona. Nakao et al.⁵⁵ encontraron que la administración de agua rica en hidrógeno (1.2 mg/L) a pacientes con síndrome metabólico aumentó los niveles de SOD y los de HDL, previno la peroxidación de lípidos e incrementó los niveles de bilirrubina la cual, a niveles menores de los reportados como tóxicos, brindan protección contra enfermedades cardiovasculares⁵⁵. En el cuadro III se presenta una lista de los efectos del hidrógeno en modelos experimentales y en pacientes.

CONCLUSIONES

Las evidencias presentadas sugieren que el hidrógeno es otro gas con potencial terapéutico y que sus propiedades antioxidantes están asociadas a sus efectos citoprotectores.

APOYO RECIBIDO

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT #IN201910) de la UNAM.

Estudio	Referencia
Daño hepático inducido por: -Isquemia reperfusión en ratones macho C57BL/6N -Inflamación crónica hepática asociada con Schistosomiasis en ratones CBA/J. -Ligamiento del ducto biliar en ratos macho Sprague Dawley	Fukuda et al. ³³ Gharib et al. ³⁴ Liu et al. ³²
Daño renal inducido por: -Cisplatino en ratos Sprague Dawley y en ratones C57BL/6CrSlc -Isquemia reperfusión en ratos Wistar	Kitamura et al. ³⁶ ; Nakashima-Kamimura et al. ³⁵ Shingu et al. ³⁷
Daño cerebral inducido por: -Isquemia-reperfusión focal en ratos Sprague-Dawley -Hipoxia-isquemia neonatal en ratos Sprague-Dawley -Isquemia-reperfusión en rebanadas de cerebro de ratones knockout SMP30/GNL deficientes en vitamina C	Ohsawa et al. ²⁹ Cai et al. ^{39,40} Sato et al. ³⁸
Toxicidad por menadiona o antimicina A. Células PC12. Isquemia reperfusión in vitro. Neuronas corticales de rata	Oshawa et al. ²⁹
Alzheimer. Modelo inducido por el péptido beta-amiloide en ratos Sprague-Dawley.	Li et al. ⁴¹
Parkinson. Degeneración nigroestriatal inducida por 6-hidroxi dopamina en ratos Sprague-Dawley.	Fu et al. ⁴³
Daño cognitivo. Estrés por inmovilización física crónica en ratones ICR.	Nagata et al. ⁴³
Daño a la columna vertebral. Contusión en ratos Sprague Dawley.	Chen et al. ⁴⁵
Daño al miocardio. Isquemia-reperfusión en ratos Sprague-Dawley y Wistar.	Hayashida et al. ³⁰ Sun et al. ⁴⁶
Daño intestinal. Isquemia-reperfusión en ratos Sprague-Dawley. Inflamación intestinal. Sulfato de sodio dextrán en ratones BALB/c.	Chen et al. ⁴⁷ , Zheng et al. ⁴⁸ Kajiya et al. ⁴⁹
Daño pulmonar. Isquemia reperfusión intestinal en ratos Sprague Dawley.	Mao et al. ⁵⁰

Cuadro III. Actividad protectora del hidrógeno: estudios en animales experimentales y en humanos.

Estudio	Referencia
Trasplante intestinal. En ratos Sprague-Dawley endogámicas.	Buchholz et al. ⁵¹
Trasplante renal. Los aloinjertos de las ratos Lewis se trasplantaron a las ratos Brown Norway.	Cardinal et al. ³¹
Aterosclerosis. Ratones deficientes en apolipoproteína E.	Ohsawa et al. ⁵²
Hipersensibilidad inducida con inmunoglobulina E anti-dinitrofenol en ratones ICR y en células cebadas.	Itoh et al. ⁵³
Diabetes. Estudio en treinta pacientes con diabetes tipo II y seis pacientes con deterioro para tolerar la glucosa.	Kajiyama et al. ⁵⁴
Síndrome metabólico. Pacientes con síndrome metabólico potencial (diez mujeres y diez hombres).	Nakao et al. ⁵⁵

Cuadro III. Actividad protectora del hidrógeno: estudios en animales experimentales y en humanos.

REFERENCIAS

- Shirahata S. Reduced water for prevention of diseases. *Animal cell technology: Basis and Applied Aspects* 2002; 12: 25-30.
- Tanaka N, Tanaka N, Fujisawa T, Daimon T, Fujiwara K, Yamamoto M, Abe T. The use of electrolyzed solutions for the cleaning and disinfecting of dialyzers. *Artif Organs* 2000; 24: 921-928.
- Quan Y, Choi KD, Chung D, Shin IS. Evaluation of bactericidal activity of weakly acidic electrolyzed water (WAEW) against *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol* 2010; 136(3): 255-260.
- Yahagi N, Kono M, Kitahara M, Ohmura A, Sumita O, Hashimoto T, Hori K, Ning-Juan C, Woodson P, Kubota S, Murakami A, Takamoto S. Effect of electrolyzed water on wound healing. *Artif Organs* 2000; 24: 984-987.
- Hayashi H. Clinical Applications of electrolyzed-reduced water. Symposium "Advanced functional foods and water for prevention of disease". 2000.
- Shirahata S, Kabayama S, Nakano M, Miura T, Kusumoto K, Gotoh M, Hayashi H, Otsubo K, Morisawa S, Katakura Y. Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 269-274.
- Tsai CF, Hsu YW, Chen WK, Ho YC, Lu FJ. Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells due to electrolyzed-reduced water and glutathione. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009b; 73: 280-287.
- Hanaoka K, Sun D, Lawrence R, Kamitani Y, Fernandes G. The mechanism of the enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water produced by electrolysis. *Biophys Chem* 2004; 107: 71-82.

9. Ye J, Li Y, Hamasaki T, Nakamichi N, Komatsu T, Kashiwagi T, Teruya K, Nishikawa R, Kawahara T, Osada K, Toh K, Abe M, Tian H, Kabayama S, Otsubo K, Morisawa S, Katakura Y, Shirahata S. Inhibitory effect of electrolyzed reduced water on tumor angiogenesis. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 19-26.
10. Huang KC, Yang CC, Lee KT, Chien CT. Reduced hemodialysis-induced oxidative stress in end-stage renal disease patients by electrolyzed reduced water. *Kidney Int* 2003; 64: 704-714.
11. Lee MY, Kim YK, Ryoo KK, Lee YB, Park EJ. Electrolyzed-reduced water protects against oxidative damage to DNA, RNA, and protein. *Appl Biochem Biotechnol* 2006; 135: 133-144.
12. Huang KC, Yang CC, Hsu SP, Lee KT, Liu HW, Morisawa S, Otsubo K, Chien CT. Electrolyzed-reduced water reduced hemodialysis-induced erythrocyte impairment in end-stage renal disease patients. *Kidney Int* 2006; 70: 391-398.
13. Hanaoka K. Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions. *J Appl Electrochem* 2001; 31: 1307-1313.
14. Hiraoka A, Takemoto M, Suzuki T, Shinohara A, Chiba M, Shirao M, Yoshimura Y. Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of "active hydrogen". *J Health Sci* 2004; 50(5): 456-465.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2007.
16. Park SK, Qi XF, Song SB, Kim DH, Teng YC, Yoon YS, Kim KY, Li JH, Jin D, Lee KJ. Electrolyzed-reduced water inhibits acute ethanol-induced hangovers in Sprague-Dawley rats. *Biomed Res* 2009; 30: 263-269.
17. Jin D, Ryu SH, Kim HW, Yang EJ, Lim SJ, Ryang YS, Chung CH, Park SK, Lee KJ. Anti-diabetic effect of alkaline-reduced water on OLETF rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70(1): 31-37.
18. Kim MJ, Kim HK. Anti-diabetic effects of electrolyzed reduced water in streptozotocin-induced and genetic diabetic mice. *Life Sci* 2006; 79: 2288-2292.
19. Kim MJ, Jung KH, Uhm YK, Leem KH, Kim HK. Preservative effect of electrolyzed reduced water on pancreatic beta-cell mass in diabetic db/db mice. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 234-236.
20. Li Y, Nishimura T, Teruya K, Maki T, Komatsu T, Hamasaki T, Kashiwagi T, Kabayama S, Shim SY, Katakura Y, Osada K, Kawahara T, Otsubo K, Morisawa S, Ishii Y, Gadek Z, Shirahata S. Protective mechanism of reduced water against alloxan-induced pancreatic beta-cell damage: Scavenging effect against reactive oxygen species. *Cytotechnology* 2002; 40: 139-149.
21. Nishikawa R, Teruya K, Katakura Y, Osada K, Hamasaki T, Kashiwagi T, Komatsu T, Li Y, Ye J, Ichikawa A, Otsubo K, Morisawa S, Xu Q, Shirahata S. Electrolyzed reduced water supplemented with platinum nanoparticles suppresses promotion of two-stage cell transformation. *Cytotechnology* 2005; 47(1-3): 97-105.
22. Lee KJ, Park SK, Kim JW, Kim GY, Ryang YS, Kim GH, Cho HC, Kim SK, Kim HW. Anticancer effect of alkaline reduced water. *J Int Soc Life Inf Sci* 2004; 22 (2): 302-305.
23. Tsai CF, Hsu YW, Chen WK, Chang WH, Yen CC, Ho YC, Lu FJ. Hepatoprotective effect of electrolyzed reduced water against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 2031-2036.
24. Nakayama M, Kabayama S, Terawaki H, Nakayama K, Kato K, Sato T, Ito S. Less-oxidative hemodialysis solution rendered by cathode-side application of electrolyzed water. *Hemodial Int* 2007; 11: 322-327.
25. Nakayama M, Kabayama S, Nakano H, Zhu WJ, Terawaki H, Nakayama K, Katoh K, Satoh T, Ito S. Biological effects of electrolyzed water in hemodialysis. *Nephron Clin Pract* 2009; 112: c9-c15.
26. Huang KC, Hsu SP, Yang CC, Ou-Yang P, Lee KT, Morisawa S, Otsubo K, Chien CT. Electrolysed-reduced water dialysate improves T-cell damage in end-stage renal disease patients with chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(8): 2730-2737.
27. George JF, Agarwal A. Hydrogen: another gas with therapeutic potential. *Kidney Int* 2010; 77: 85-87.
28. Wood KC & Gladwin MT. The hydrogen highway to reperfusion therapy. *Nat Med* 2007; 13(6): 673-674.
29. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007; 13(6): 688-694.
30. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373: 30-35.
31. Cardinal JS, Zhan J, Wang Y, Sugimoto R, Tsung A, McCurry KR, Billiar TR, Nakao A. Oral hydrogen water prevents chronic allograft nephropathy in rats. *Kidney Int* 2010; 77: 101-109.
32. Liu Q, Shen WF, Sun HY, Fan DF, Nakao A, Cai JM, Yan G, Zhou WP, Shen RX, Yang JM, Sun XJ. Hydrogen-rich saline protects against liver injury in rats with obstructive jaundice. *Liver Int* 2010; 30(7): 958-968.
33. Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 670-674.
34. Gharib B, Hanna S, Abdallahi OM, Lepidi H, Gardette B, De Reggi M. Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *C R Acad Sci III* 2001; 324(8): 719-724.
35. Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, Asoh S, Ohta S. Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009; 64: 753-761.
36. Kitamura A, Kobayashi S, Matsushita T, Fujinawa H, Murase K. Experimental verification of protective effect of hydrogen-rich water against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats using dynamic contrast-enhanced CT. *Br J Radiol* 2010; 83: 509-514.
37. Shingu C, Koga H, Hagiwara S, Matsumoto S, Goto K, Yokoi I, Noguchi T. Hydrogen-rich saline solution attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *J Anesth* 2010; 24(4): 569-574.

38. Sato Y, Kajiyama S, Amano A, Kondo Y, Sasaki T, Handa S, Takahashi R, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Fujinawa H, Mori T, Ohta M, Obayashi H, Maruyama N, Ishigami A. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brain slices of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 375(3): 346-350.
39. Cai J, Kang Z, Liu WW, Luo X, Qiang S, Zhang JH, Ohta S, Sun X, Xu W, Tao H, Li R. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci Lett* 2008; 441: 167-172.
40. Cai J, Kang Z, Liu K, Liu W, Li R, Zhang JH, Luo X, Sun X. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Brain Res* 2009; 1256: 129-137.
41. Li J, Wang C, Zhang JH, Cai JM, Cao YP, Sun XJ. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Res* 2010; 1328: 152-161.
42. Abou-Sleiman PM, Muqit MM, Wood NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(3): 207-219.
43. Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Suzuki Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K. Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009; 453: 81-85.
44. Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34: 501-508.
45. Chen C, Chen Q, Mao Y, Xu S, Xia C, Shi X, Zhang JH, Yuan H, Sun X. Hydrogen-rich saline protects against spinal cord injury in rats. *Neurochem Res* 2010; 35(7): 1111-1118.
46. Sun Q, Kang Z, Cai J, Liu W, Liu Y, Zhang JH, Denoble PJ, Tao H, Sun X. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Biol Med* 2009; 234: 1212-1219.
47. Chen H, Sun YP, Hu PF, Liu WW, Xiang HG, Li Y, Yan RL, Su N, Ruan CP, Sun XJ, Wang Q. The effects of hydrogen-rich saline on the contractile and structural changes of intestine induced by ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res* 2009. En prensa.
48. Zheng XF, Mao Y, Cai J, Li Y, Liu W, Sun P, Zhang JH, Sun X, Yuan H. Hydrogen-rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Free Radic Res* 2009; 43(5): 478-484.
49. Kajiyama M, Silva MJ, Sato K, Ouhara K, Kawai T. Hydrogen mediates suppression of colon inflammation induced by dextran sodium sulfate. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386: 11-15.
50. Mao YF, Zheng XF, Cai JM, You XM, Deng XM, Zhang JH, Jiang L, Sun XJ. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 381(4): 602-605.
51. Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar TR, McCurry KR, Bauer AJ, Nakao A. Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 2008; 8: 2015-2024.
52. Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, Ishikawa M, Ohta S. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377(4): 1195-1198.
53. Itoh T, Fujita Y, Ito M, Masuda A, Ohno K, Ichihara M, Kojima T, Nozawa Y, Ito M. Molecular hydrogen suppresses FcεRI-mediated signal transduction and prevents degranulation of mast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389(4): 651-656.
54. Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 2008; 28: 137-143.
55. Nakao A, Toyoda Y, Sharma P, Evans M, Guthrie NJ. Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome—an open label pilot study. *Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 140-149.