

## **Evaluación de los potenciales efectos beneficiosos del consumo de agua alcalinizada sobre el desarrollo tumoral en ratones.**

Raquel García-Gómez<sup>1</sup>, Ignacio Prieto<sup>1</sup>, María Monsalve<sup>1,\*</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM). Arturo Duperier 4. 28029-Madrid (Spain).

\*Correspondence should be addressed to María Monsalve; mpmonsalve@iib.uam.es

### **Abstract**

Los posibles beneficios para la salud del uso regular de filtros de agua que aumentan el pH del agua del grifo (agua alcalina) se han debatido ampliamente, pero faltan pruebas experimentales o, al menos, están incompletas. El objetivo del estudio fue, por tanto, abordar los efectos de la ingesta regular de agua alcalina frente al agua del grifo en el desarrollo de tumores utilizando modelos de ratón. Se probaron tres protocolos en ratones C57BL6 a los que se les permitió acceso libre al agua filtrada (alcalina) o del grifo desde el destete. Para evaluar el impacto en un modelo que recapitula las primeras etapas del desarrollo tumoral, los ratones fueron sometidos a una dieta inductora de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) utilizando una combinación de dieta alta en grasas y exposición a dos agentes teratogénicos, DEN (50 µg/l) y TCPOBOP (0,5 µg/g) durante 24 semanas. Se observó que, la proliferación de miofibroblastos fue significativamente menor en el hígado de los animales que recibieron agua alcalina y la tinción con VEGFR2 fue mayor en la vasculatura, lo que sugiere una etapa de la enfermedad menos avanzada. Se inyectaron células de melanoma B16-V5 por vía subcutánea o a través de la vena de la cola para generar tumores primarios o nódulos metastásicos pulmonares, respectivamente. En comparación con los ratones de control, los tumores subcutáneos de los ratones expuestos a agua alcalina mostraron un índice de proliferación más bajo, un desarrollo de angiogénesis más pobre y una vasculatura con una capa y estructura de la íntima mejor conservadas. De acuerdo con estos resultados, el número de nódulos metastásicos pulmonares fue menor en los ratones expuestos a agua filtrada. En general, nuestros resultados indican que el agua alcalina podría tener un efecto relevante en el desarrollo de tumores, en particular en la proliferación celular y en la preservación de la capa íntima vascular, lo que podría reducir la incidencia de metástasis.

### **Introduction**

La composición química del agua potable depende de muchos factores como la temporada [1], el volumen relativo de agua de lluvia caído [2], el suelo regional subyacente [3] y los procesos de tratamiento del agua [4], entre otros. De hecho, la composición química de las muestras tomadas del mismo lugar puede variar de un año a otro y, en consecuencia, la evaluación de cómo el consumo regular de cualquier agua potable del grifo puede afectar nuestra salud es una tarea compleja, desafiante e incluso abrumadora. La presencia cada vez mayor y muy variable de subproductos contaminantes de la actividad humana, como metales [5], microplásticos [6], otros compuestos orgánicos persistentes y xenobióticos en general [7], complica aún más el panorama general.

No obstante, es evidente que la calidad del agua, al igual que la calidad de los alimentos, juega un papel clave en la salud humana [8], y una creciente preocupación por la calidad del agua potable ha impulsado el consumo de agua embotellada [9]. Las iniciativas y regulaciones que apuntan a una reducción en el uso de plástico [10], junto con una amplia evidencia que indica la presencia de compuestos derivados del plástico potencialmente tóxicos en el agua embotellada [11], a su vez, ha impulsado el interés en alternativas más seguras, principalmente sistemas de filtro de carbón, que han demostrado reducir significativamente la concentración de varios productos químicos potencialmente peligrosos en el agua [10], y envases alternativos de Tetra Pak, aunque el uso en Tetra Pak de polietileno también presenta riesgos potenciales para la salud [12]. Del mismo modo, la composición química del agua embotellada y filtrada varía ampliamente y es difícil evaluar adecuadamente el impacto de cualquier composición de agua en la salud humana. Por lo tanto, mientras que una gran cantidad de estudios han evaluado cómo los diferentes nutrientes o regímenes nutricionales impactan nuestra salud [13], los estudios sobre el agua son comparativamente pocos y generalmente de alcance muy limitado.

Los sistemas de filtrado de agua para uso doméstico (filtros de agua en el lugar de uso) pueden agruparse en cuatro tipos básicos: los que eliminan partículas sólidas, incluidas las bacterias, pero no afectan la química del agua [14]; los que disminuyen la concentración total de iones mediante ósmosis inversa, que se utilizan ampliamente en las regiones costeras [15]; los que se basan en carbón activado, que son los más utilizados en los países occidentales y son particularmente eficaces para eliminar el Cl<sup>-</sup> y los compuestos orgánicos volátiles, pero no eliminan las sales inorgánicas [16]; y sistemas que tienen como objetivo "corregir" el pH anormalmente bajo que se encuentra comúnmente en el agua del grifo desinfectada y son adiciones relativamente nuevas al mercado. Estos sistemas aumentan el pH del agua al filtrar o electrolizar el agua.

La mayoría de los estudios sobre los posibles beneficios para la salud del agua alcalina se han centrado en los trastornos gastrointestinales, en particular, se ha recomendado para pacientes con acidosis gástrica [17], y la evidencia acumulada ha llevado a la aprobación de aparatos de agua alcalina electrolizada como dispositivos médicos en Japón. Se ha prestado menos atención científica a otros posibles beneficios para los usuarios en ausencia de molestias abdominales derivadas de una mejora esperada en el equilibrio redox de todo el cuerpo. En particular, se ha debatido ampliamente el potencial del agua alcalina para afectar el desarrollo de tumores, pero se han realizado pocos estudios científicos significativos en modelos animales o humanos. Una revisión sistemática de 2016 realizada por Fenton y Huang [18] encontró "... una falta de evidencia a favor o en contra de la carga ácida y / o del agua alcalina de la dieta para el inicio o el tratamiento del cáncer". Un estudio más reciente informó que el agua alcalina podría inhibir el crecimiento y la proliferación de una línea celular de cáncer de mama cultivada [19].

En el presente estudio, nuestro objetivo fue determinar el impacto de la ingesta diaria de agua alcalina filtrada (Alkanatur®) frente al agua del grifo, de la ciudad de Madrid, sobre el desarrollo tumoral en ratones. Se realizaron tres estudios diferentes: se inyectaron células de melanoma B16-V5 por vía subcutánea o a través de la vena de la cola para generar tumores primarios o nódulos metastásicos pulmonares, respectivamente. Además, para evaluar el

impacto del agua alcalina en un modelo que recapitula las primeras etapas del desarrollo tumoral, se indujo esteatohepatitis no alcohólica (NASH) en ratones utilizando una combinación de dieta alta en grasas y exposición a dos agentes teratogénicos. Los resultados obtenidos indican que el agua alcalina Alkanatur® podría tener un efecto relevante sobre el desarrollo de tumores sobre el agua del grifo, en particular sobre la proliferación celular y sobre la preservación de la capa íntima vascular y, lo que podría tener un impacto positivo en la incidencia de metástasis.

## Materials and Methods

*Ratones.* En este estudio se utilizaron ratones macho C57BL/6. Los animales fueron criados y alojados en el Animalario del Instituto de Investigaciones Biológicas Alberto Sols (CSIC-UAM). Los protocolos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal del IIB, el CSIC y la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (PROEX 317/15). Todos los procedimientos se ajustan a la Declaración de Helsinki. Todos los animales recibieron cuidados humanitarios de acuerdo con los criterios descritos en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” preparada por la Academia Nacional de Ciencias y publicada por los Institutos Nacionales de Salud (No. 86-23 revisado en 1985).

Después del destete, los animales se dividieron en dos grupos experimentales: a un grupo se le dio acceso libre al agua del grifo (no filtrada, no esterilizada) disponible en el Instituto, y a un segundo grupo se le dio el mismo agua pero previamente filtrada usando el sistema de filtrado de agua alcalina ionizada Alkanatur®. El agua se cambió diariamente hasta que se sacrificaron los animales. A las 12 semanas de edad, los animales se expusieron a los protocolos de desarrollo de tumores que se describen a continuación. Cada grupo experimental incluyó 8 animales para garantizar al menos 6 por grupo para el análisis estadístico.

*Crecimiento experimental del tumor primario.* Se inyectaron un total de  $0,5 \times 10^6$  células B15-V5 de melanoma de ratón por vía subcutánea en la espalda de ratones machos de 12 semanas de edad, y 12 días después se sacrificaron con dislocación cervical y los tumores se disecaron y fijaron en paraformaldehído al 4% para análisis histológico. El volumen del tumor se midió usando calibradores y se calculó a partir de la fórmula  $\frac{4}{3} * \pi * \text{ancho} * \text{largo} * \text{alto}$ .

*Ensayo experimental de metástasis.* Se inyectaron un total de  $0,5 \times 10^6$  células B15-V5 en la vena lateral de la cola de ratones machos de 12 semanas de edad, y 12 días después se sacrificó a los ratones y se disecaron los pulmones y se fijaron con la solución de Bouin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) para análisis histológico.

*Cultivo de células.* Se cultivaron células de melanoma murino B16-V5 proporcionadas originalmente por el Dr. MS Soengas (CNIO, Madrid) en DMEM con FBS al 10%, glutamina 2 mM y antibióticos.

*Inducción de hepatocarcinoma.* Se alimentó a ratones machos de 12 semanas de edad con una dieta rica en grasa (HFD) (TD88137; Harlan, Barcelona, España) para inducir

esteatosis hepática. Los animales fueron tratados simultáneamente con dos teratógenos: 1,4-bis- [2- (3,5, -dicloropiridiloxi)] benceno (TCPOBOP), que se inyectó por vía intraperitoneal (ip) a una dosis de 0,5 µg / g una vez por semana; y dietilnitrosamina (DEN), que se administró a una dosis de 50 µg / l en el agua de bebida. Los animales se sacrificaron a las 36 semanas de edad y los hígados se disecaron y fijaron con solución de Bouin (Sigma-Aldrich) para análisis histológico.

*Tinción con hematoxilina-eosina.* Las secciones de tejido se fijaron en formalina tamponada al 10%, se embebieron en parafina y las secciones de 4 µm se cortaron, desparafinaron e hidrataron. Las secciones se tiñeron durante 3 min con hematoxilina de Harris y 2 min con eosina (H&E). Finalmente, los portaobjetos se deshidrataron y se montaron con DPx Mountant (Sigma-Aldrich). Las imágenes se adquirieron con un microscopio Nikon E90i equipado con una cámara DS-Fi1 (Nikon, Tokio, Japón) y se analizaron utilizando el software ImageJ (NIH).

*Inmunohistoquímica.* La fijación y tinción se realizaron usando el kit Vectastain ABC y el kit de sustrato de peroxidasa DAB (ambos de Vector Laboratories, Burlingame, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron con anticuerpos primarios anti-Ki67 (RM-9106-S1; Thermo Scientific, Wilmington, DE) o anti-F4 / 80 (MCA497; AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) y luego con los correspondientes anticuerpos secundarios ligados a la fosfatasa alcalina y finalmente desarrollado. Las imágenes se adquirieron y analizaron como para la tinción H&E.

*Inmunofluorescencia.* Los procedimientos de fijación, tinción y análisis fueron los descritos anteriormente [20]. Los anticuerpos fueron  $\alpha$ -actina de músculo liso (SMA) -Cy3 (Sigma-Aldrich), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). La inmunofluorescencia de VEGFR2 se detectó mediante incubación con un anticuerpo secundario fluorescente (FITC, Sigma-Aldrich). A continuación, las muestras se tiñeron con DAPI (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), se montaron y visualizaron usando un microscopio confocal Nikon A1R o un Zeiss LSM 700 y se analizaron con ImageJ para determinar el área positiva frente al área total de tejido.

*Extracción de proteínas y Western Blot (WB).* Se prepararon extractos de células enteras como se describió anteriormente [21]. Las proteínas se separaron usando geles SDS-PAGE al 12% y se transfirieron a membranas PVDF Amersham Hybond-P (GE healthcare) mediante transferencia semiseca usando el sistema TransBlot SD (Bio-Rad). Se utilizó 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) Antiboy (Alpha Diagnostic Int.). La cuantificación de la tinción de Red Ponceau de la proteína total transferida se utilizó como control de carga. Se utilizó el software ImageJ para analizar las bandas.

*Análisis estadístico.* Los datos se expresan como media  $\pm$  DE. La significancia estadística se evaluó utilizando una prueba *t* de dos colas no apareada. Los valores se consideraron estadísticamente significativos a  $p < 0,05$ .

## Resultados and Discusión

### NAFLD

El primer protocolo tuvo como objetivo evaluar las etapas iniciales del desarrollo del tumor. Elegimos un modelo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC) inducido por una combinación de HFD y la administración de dos teratógenos: TCPOBOP (0.5 µg/g) administrado ip semanalmente y DEN (50 µg/l) disuelto en el agua de bebida. Este modelo comparte características con el carcinoma hepatocelular en humanos, que puede progresar desde una enfermedad hepática no alcohólica (NAFLD). Es importante destacar que el hígado también es un órgano metabólico central y, como tal, es particularmente sensible a los agentes tanto beneficiosos como perjudiciales derivados de la dieta. La dieta y el tratamiento con teratógenos se inició cuando los animales tenían 12 semanas y los animales se sacrificaron a las 36 semanas de edad. Los animales se dividieron desde el destete en dos grupos, un grifo de comedor y el otro agua filtrada alcalina. El agua se cambió diariamente hasta que se sacrificaron los ratones.

El seguimiento del aumento de peso durante el tratamiento, no mostró diferencias significativas entre los grupos (Sup. Fig. 1A). La evaluación macroscópica inicial de los hígados no mostró la presencia de tumores en ninguno de los ratones (Fig. 1A, panel derecho). Tampoco hubo diferencias evidentes entre los dos grupos en el color del hígado, lo que sugeriría diferencias relevantes en el nivel de esteatosis (Fig. 1A, panel derecho). Sin embargo, el análisis histológico de las secciones de hígado mostró un claro desarrollo de NAFLD en ambos grupos, como lo revela la tinción H&E, con la presencia de macro y microsteatosis, así como destrucción del parénquima, lo que sugirió la presencia de fibrosis e inflamación avanzadas, ambas características de NAFLD (Fig. 1A, panel izquierdo). En particular, esta evaluación preliminar sugirió un grado más bajo de esteatosis y una mejor conservación del parénquima en los ratones expuestos a agua filtrada (Fig. 1A, panel izquierdo).

Para medir el impacto patológico de estas diferencias, determinamos el nivel de fibrosis por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra SMA, que marca los miofibroblastos, y también evaluamos el estado inflamatorio utilizando un anticuerpo dirigido contra la proteína F4/80, que marca los macrófagos y Küppfer Cells residentes. Encontramos que los ratones tratados con agua filtrada tenían, en promedio, niveles más bajos de tinción de SMA (Fig. 1D-F) y F4/80 (Fig. 1C), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. La inflamación normalmente se asocia con altos niveles de estrés oxidativo y el consiguiente aumento de proteínas modificadas. Usamos como marcador de estrés oxidativo la evaluación de los niveles de proteínas modificadas por 4-HNE mediante WB y observamos que los niveles de proteínas modificadas por 4-HNE fue significativamente más bajo en ratones expuestos a agua filtrada (Sup. Fig. 1B).

Con el objetivo de determinar la relevancia de estos hallazgos, analizamos a continuación las tasas de proliferación de células hepáticas utilizando un anticuerpo dirigido contra el antígeno de proliferación Ki67. Los niveles totales de núcleos positivos para Ki67/número total de núcleos es un buen indicador del nivel general de proliferación e incluye no solo los hepatocitos, que proliferan como parte de una respuesta de regeneración tisular, sino también los miofibroblastos y las células inmunitarias activadas (tanto residentes como infiltrado). Encontramos que los índices de proliferación fueron significativamente más bajos

en el hígado de los ratones expuestos a agua filtrada que en los que recibieron agua del grifo (Fig. 1B), lo que sugiere que la patología en los primeros está menos avanzada.

La entrada de nutrientes y toxinas en el parénquima hepático se produce a través del árbol vascular, y los cambios patológicos que caracterizan NAFLD suelen ser evidentes por primera vez en la vasculatura hepática, afectando al acceso y procesamiento de nutrientes por los hepatocitos. En consecuencia, buscamos evaluar la disfunción vascular en hígados mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo dirigido contra VEGFR2, un marcador específico de células endoteliales vasculares. VEGFR2 es el principal receptor del factor de angiogénesis VEGF-A. El marcaje de VEGFR2 se comparó con el de SMA, que marca la capa media vascular (Fig. 1E-F). Encontramos que, en comparación con los animales con agua filtrada, la vasculatura del hígado de los animales con agua del grifo estaba más dilatada, una característica de NAFLD, y tenía niveles significativamente más bajos de inmunorreactividad a VEGFR2, lo que sugería la presencia de disfunción vascular (Fig. 1E-F). otra característica que contribuye al desarrollo de la enfermedad. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los animales expuestos a agua alcalina muestran NAFLD menos avanzado, lo que podría afectar el desarrollo de HCC.

Fig. 1

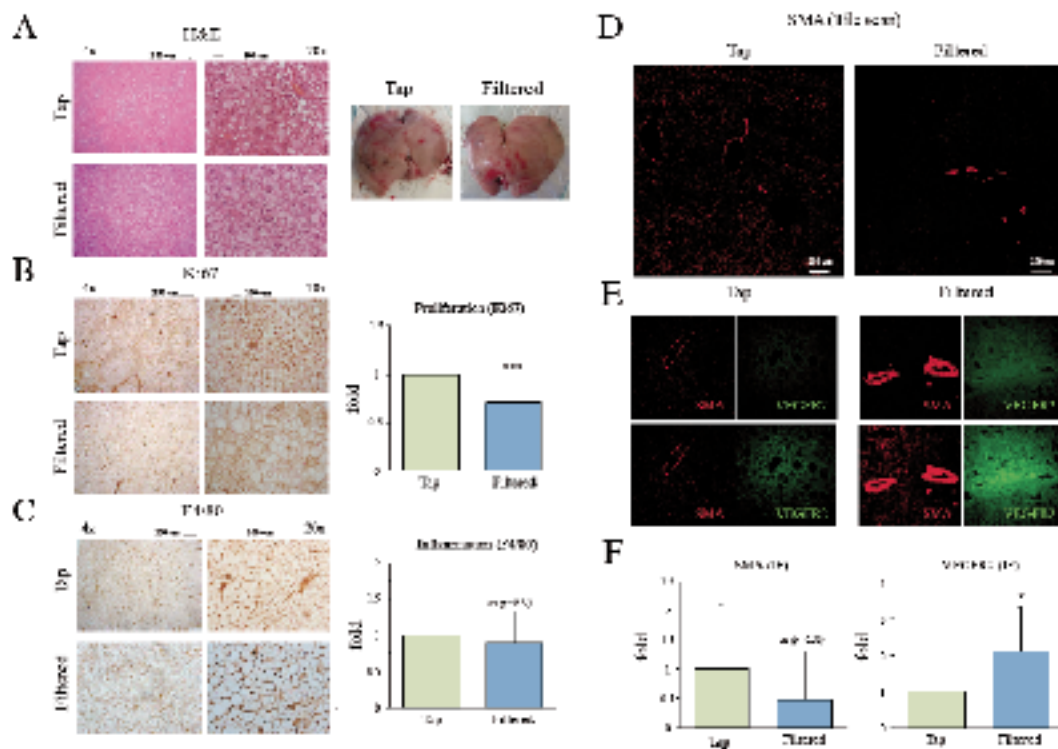


Fig. 1: Inducción de NAFLD por dieta en ratones tratados con agua del grifo o filtrada. (a) Izquierda, tinción H&E de cortes histológicos hepáticos. Panel derecho. Imágenes de hígado completo. (b) Izquierda, tinción IHQ Ki67 de cortes histológicos hepáticos. Derecha, análisis cuantitativo de células Ki67+. (c) Izquierda, tinción IHQ F4/80 de cortes histológicos hepáticos. Derecha, análisis cuantitativo de células F4/80+. (d) Tinción IF de SMA en cortes histológicos hepáticos. Imágenes de proyección máxima de cortes de tejido, adquiridos con un microscopio confocal por capas. (e) Tinción IF contra SMA (rojo) y VEGF2 (verde) de secciones histológicas de hígado. (f) Análisis

cuantitativo de IF contra SMA (izquierda) y VEGF2 (derecha). Los datos son media  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,005$ . ns = no significativo.

## Tumores Primarios

Para evaluar más directamente si la capacidad proliferativa de las células tumorales *in vivo* era diferente entre los ratones expuestos al agua del grifo o filtrada desde el destete, se inyectaron subcutáneamente en ratones de 12 semanas de edad, células de melanoma B16-V5. Estas células proliferan muy rápidamente *in vivo*, formando grandes tumores primarios en menos de dos semanas. Doce días después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se diseccionaron y midieron los tumores. No se encontraron diferencias significativas para el volumen tumoral entre los dos grupos ( $p < 0,21$ ), aunque hubo una tendencia hacia un tamaño de volumen medio mayor en el grupo con acceso a agua filtrada (Fig. 2A, C).

El análisis cualitativo de las secciones histológicas del tumor mediante tinción con H&E sugirió que los tumores de los ratones expuestos al agua filtrada estaban más encapsulados y eran menos hemorrágicos que los expuestos al agua del grifo (Fig. 2B), lo que podría ser consistente con una menor tendencia a promover procesos metastásicos. Para probar esa posibilidad, primero medimos la proliferación mediante el marcaje con anticuerpos anti Ki67. Notamos que los tumores de los ratones del grupo de agua filtrada tenían un grado de proliferación significativamente menor que los del grupo de agua del grifo (Fig. 2B-C), lo que podría sugerir tumores menos agresivos. Dado que el desarrollo tumoral se asocia normalmente a un proceso inflamatorio, analizamos el nivel de infiltrado inflamatorio utilizando un anticuerpo dirigido contra F4/80. No pudimos detectar diferencias significativas entre los grupos, aunque los valores medios fueron menores en el grupo de ratones tratados con agua filtrada (Fig. 2B-C).

A continuación, evaluamos el nivel de angiogénesis en los tumores, una característica asociada con la etapa de desarrollo del tumor y el riesgo de metástasis [22]. Examinamos la capa de medio vascular usando un anticuerpo contra SMA y analizamos el área positiva por sección. Encontramos que el nivel de vascularización era significativamente más bajo en ratones tratados con agua filtrada que con agua del grifo (Fig. 2D-F). A continuación, analizamos la calidad de las estructuras vasculares mediante el marcador endotelial VEGFR2. Encontramos que, de acuerdo con los hallazgos en el hígado, la expresión de VEGFR2 era significativamente mayor en los animales tratados con agua filtrada, lo que sugiere una mejor estructura vascular (Fig. 2E-F). El nivel reducido de vascularización podría ser compatible con un tumor de mayor tamaño y un riesgo reducido de metástasis.

Para evaluar más directamente el grado de fragilidad vascular, que está fuertemente asociado con un mayor riesgo de metástasis [23], analizamos la estructura de la vasculatura del tumor midiendo los diámetros más grande y más pequeño de los vasos, y usamos la relación de menor /promedio diámetro como índice de calidad vascular. Observamos que la estructura vascular era significativamente más circular en los ratones tratados con agua filtrada (Fig. 2F), una característica que se ha relacionado con un menor riesgo de metástasis y un mejor equilibrio redox [24, 25].

Fig. 2

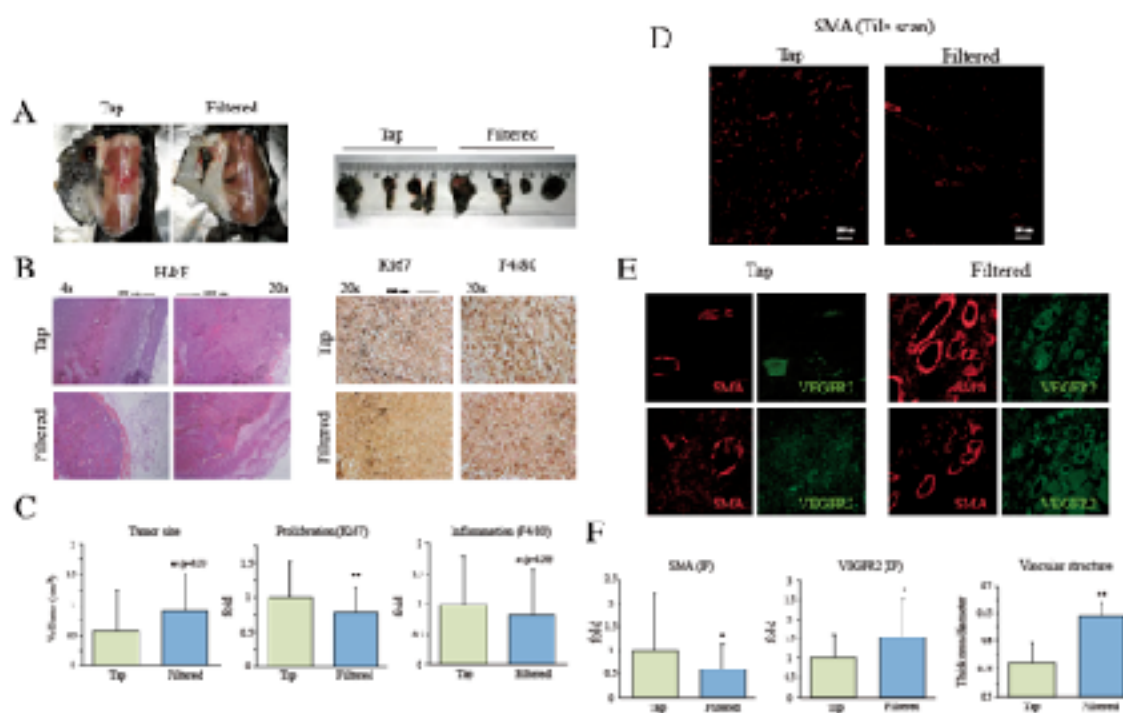


Fig. 2: Tumores primarios derivados de B16-V5 inyectado por vía subcutánea en ratones tratados con agua del grifo o filtrada. (a) Izquierda, imágenes representativas de ratones abiertos con tumores subcutáneos antes de la resección de tejido. Derecha, tumores enteros y escala. (b) Izquierda, tinción H&E de secciones histológicas tumorales. Derecha, tinción IHQ Ki67 y F4/80 de cortes histológicos tumorales. (c) Análisis cuantitativo del tamaño del tumor (izquierda), células Ki67 + (centro) y células F4/80 + (derecha). (d) Tinción IF con anticuerpos anti SMA de secciones histológicas tumorales. Imágenes de proyección máxima de cortes de tejido, adquiridos con un microscopio confocal por capas. (e) Tinción de IF contra SMA (rojo) y VEGF2 (verde) de secciones histológicas tumorales. (f) Análisis cuantitativo de SMA (izquierda), VEGF2 (centro) y estructura vascular (derecha) como se deriva de las imágenes de IF. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,005$ . ns = no significativo.

### Nodulos pulmonares metastáticos

En base a estos hallazgos, a continuación evaluamos la capacidad de las células de melanoma B16-V5 para formar nódulos pulmonares metastáticos en ratones. Los animales se dividieron desde el destete en dos grupos, uno bebiendo agua de grifo y el otro agua filtrada alcalina. El agua se cambió diariamente hasta que se sacrificaron los ratones. A las 12 semanas de edad, los ratones se inyectaron por vía intravenosa células de melanoma B16-V5 y los animales se sacrificaron 12 días después, cuando los nódulos pulmonares ya eran detectables en la mayoría de los ratones. Después de la disección pulmonar, se extrajeron los pulmones y se contó el número total de nódulos. Los resultados mostraron que el número total de nódulos era significativamente menor en animales con agua filtrada que en aquellos con agua del grifo (Fig. 3A, E), lo que sugiere que los ratones tratados con agua filtrada son más resistentes a la formación de metástasis.

El análisis estructural de las secciones de tejido usando tinción H&E (Fig. 3B) y la evaluación de la proliferación celular en los nódulos determinada por la tinción Ki67 (Fig.

3C) no mostró diferencias entre los grupos (Fig. 3B). Es importante destacar que los pulmones de animales tratados con agua filtrada también mostraron un grado más bajo de infiltrado inflamatorio, según se determinó mediante tinción con un anticuerpo F4/80 (Fig. 3D, F).

Finalmente, analizamos la vasculatura en los pulmones, ya que la presencia de disfunción endotelial es un factor facilitador clave no solo en la diseminación de las células del tumor primario sino también en el anidamiento de las células tumorales circulantes [26]. Usamos anticuerpos dirigidos contra SMA y VEGFR2 para el análisis de las muestras de tejido. De acuerdo con los hallazgos previos en el hígado y en el modelo de tumor primario, encontramos un nivel significativamente mayor de angiogénesis (evaluado como el área cubierta por vasos positivos para SMA) en animales tratados con agua del grifo (Fig. 3G-H), mientras que la tinción vascular de VEGFR2 fue significativamente menor (Fig. 3G-I), sugiriendo nuevamente una disfunción vascular más marcada en los ratones tratados con agua corriente. Estos hallazgos probablemente sean relevantes para la migración de las células tumorales circulantes a los tejidos y, por lo tanto, la formación de nódulos pulmonares metastásicos.

En resumen, todos estos datos son consistentes con un modelo según el cual el consumo de agua filtrada (Alkanatur®) podría preservar mejor la función vascular en los tumores y por ende la respuesta del organismo al proceso de desarrollo tumoral, tanto primario como metastásico, y también podría tener un impacto en el desarrollo general de NAFLD.

Fig. 3

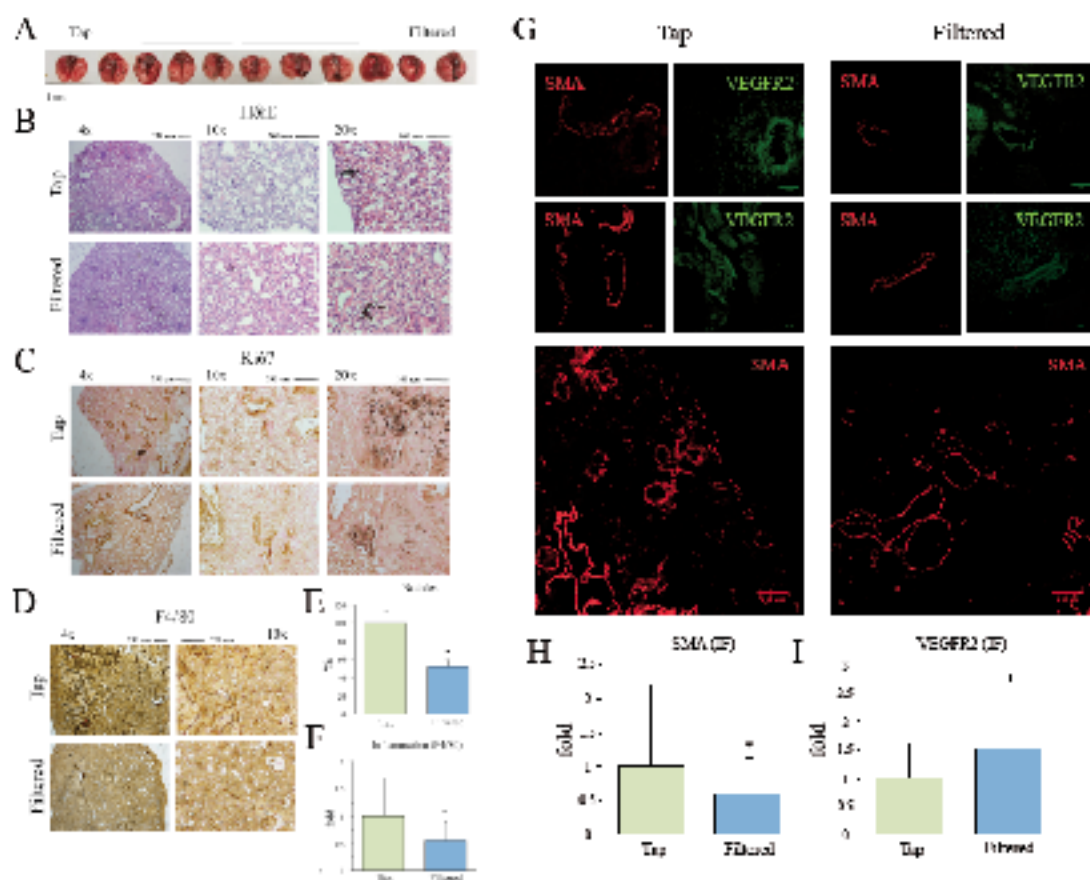


Fig. 3: Nódulos pulmonares metastásicos derivados de B16-V5 mediante inyección iv en ratones tratados con agua del grifo o filtrada. (a) Imágenes de todo el pulmón. (b) Tinción H&E de cortes histológicos de pulmón. (c) Tinción IHQ Ki67 de cortes histológicos de pulmón. (d) Tinción IHQ F4 / 80 de cortes histológicos de pulmón. (e) Análisis cuantitativo de nódulos pulmonares. (f) Análisis cuantitativo de células F4 / 80 +. (g) Tinción superior, IF SMA (rojo) y VEGF2 (verde) de secciones histológicas de pulmón. Abajo, tinción IF SMA de secciones histológicas tumorales. Imágenes de proyección máxima de cortes de tejido-escaneos de baldosas, adquiridos con un microscopio confocal. (h) Análisis cuantitativo de SMA. (i) Análisis cuantitativo de VEGF2. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,005$ . ns = no significativo.

## Discusión

El cambio climático global está reduciendo significativamente la precipitación media anual de agua de lluvia en países como España [27] y tiene un impacto negativo en la calidad del agua del grifo de los suministros municipales [28]. De hecho, la creciente preocupación por la calidad del agua del grifo ha aumentado el uso doméstico tanto de agua embotellada [29] como de sistemas de filtración o purificación de agua en el lugar de uso [30]. Sin embargo, las investigaciones sobre el impacto de estos dispositivos en la salud humana son escasas. En particular, hay una escasez de estudios sobre los efectos potenciales de promoción de la salud del agua alcalina en la salud humana [17,31], con resultados controvertidos [32], y la mayoría se ha centrado en su papel en la mejora del reflujo gástrico

[33]. El cáncer se reconoce ahora como una enfermedad compleja en la que el desarrollo del estado nutricional y metabólico del sujeto afectado juega un papel importante [34]. Como consecuencia, muchos estudios tienen como objetivo evaluar cómo los diferentes macro o micronutrientes, regímenes dietéticos o suplementos nutricionales influyen en el desarrollo del cáncer [35]. Los estudios que se centran en el agua en este contexto son comparativamente raros [36]. Solo muy recientemente, un creciente cuerpo de literatura centrado en los contaminantes del agua está poniendo de relieve el papel de la calidad del agua en la salud humana y, en particular, en el cáncer. Quizás no sea sorprendente que la conclusión principal sea que el agua es importante para muchas cosas, incluido el cáncer.

Los dispositivos comerciales desarrollados para aumentar el pH del agua del grifo para producir agua "alcalina" varían ampliamente en sus características y capacidades y, junto con la variabilidad en las fuentes de agua, hacen que las conclusiones generales sobre el uso de agua "alcalina" sean difíciles de extraer. En consecuencia, es fundamental resaltar la importancia de probar cada dispositivo y tipo de agua individualmente. De hecho, la principal limitación del presente estudio es la evaluación de un solo dispositivo de tipo de filtrado y una sola fuente de agua del grifo.

Provocamos procesos de desarrollo tumoral en ratones mediante protocolos que nos permitieron estudiar la tumorigénesis precoz, el desarrollo del tumor primario y también la metástasis. Descubrimos que en los tres protocolos experimentales utilizados, los ratones que tenían acceso a agua filtrada mostraban una etapa de enfermedad menos avanzada. En particular, el hallazgo más consistente fue que la calidad de la estructura vascular era significativamente mejor en los animales que consumían agua filtrada.

Primero estudiamos la tumorigénesis inicial en un modelo para el desarrollo de HCC, en el que inducimos esteatosis hepática con una HFD y luego facilitamos el desarrollo tumoral mediante la administración de dos teratógenos. Encontramos que los animales de ambos grupos desarrollaron NAFLD avanzado, pero los animales con acceso a agua filtrada tenían tasas de proliferación celular más bajas y una mejor preservación de la capa vascular íntima. Este modelo mostró consistentemente que los ratones que consumían agua filtrada tenían una tasa de proliferación celular más baja y una mejor conservación de la capa vascular íntima. De manera similar, el modelo de metástasis mostró un menor número de nódulos, una inflamación reducida y una preservación consistentemente mejor de la capa vascular íntima.

## **Conclusions**

En conjunto, estos resultados sugieren que el uso de filtros de agua puede tener efectos beneficiosos en las diferentes etapas del desarrollo tumoral y también subrayan el papel que juega la vasculatura y la preservación de una buena estructura vascular en estos procesos. También sugieren que el principal mediador de los efectos beneficiosos de este sistema de filtrado podrían ser las células endoteliales vasculares. En esta etapa no disponemos de datos que expliquen o justifiquen nuestra hipótesis sobre los posibles mecanismos implicados. Sin embargo, quizás no sea sorprendente que las células endoteliales, que están directamente expuestas al torrente sanguíneo, estén fuertemente influenciadas por el agua que bebe el

animal. De manera similar, es probable que el epitelio intestinal se vea fuertemente influenciado, como se ha observado cuando se evalúan diferentes dietas o nutrientes.

En resumen, nuestro estudio no solo respalda los posibles efectos beneficiosos del uso de un sistema de filtrado de agua, sino que también destaca la urgente necesidad de estudios similares que fomenten la discusión dentro de la comunidad científica sobre qué es y qué no es importante en el agua que bebemos.

La sección de Conclusiones debe explicar claramente los principales hallazgos e implicaciones

### Conflictos de Interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses en relación con la publicación de este artículo.

### Financiación

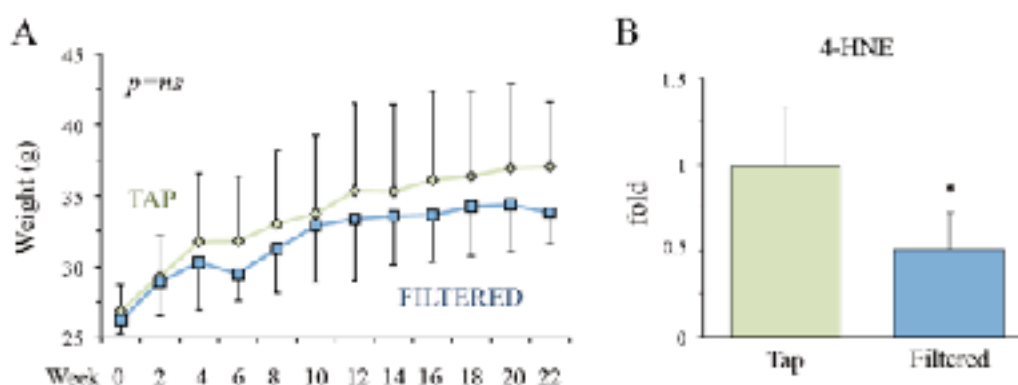
Este trabajo ha sido financiado por un “Contrato de Apoyo Tecnológico” 20174727-ALKANCER de Alkanatur SLU, fondos derivados de los proyectos del “Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades” (MICIU) y ERDF/FEDER SAF2015-63904-R and RTI2018-093864-B-I00, y de un proyecto de la Unión Europea, Horizon 2020 research and innovation programme Marie Skłodowska-Curie bajo el GA 721236-TREATMENT cuyo IP es M.M.

### Agradecimientos

Agradecemos a MS Soengas (CNIO, Madrid) que nos proporcionara la línea celular B16-V5.

### Material Suplementario

Supp. Fig. 1



**Sup. Fig. 1:** Ratones NAFLD tratados con agua del grifo o filtrada. (a) Aumento de peso durante el período de 24 semanas de dieta y administración de teratógenos. (b) Análisis de WB de los niveles de 4-HNE en extractos de hígado. Se utilizó tinción de Ponceau rojo como control de carga. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0,005$ . ns = no significativo.

## Referencias

1. Serpa, D.; Nunes, J.P.; Keizer, J.J.; Abrantes, N. Impacts of climate and land use changes on the water quality of a small Mediterranean catchment with intensive viticulture. *Environ Pollut* 2017, 224, 454-465, doi:10.1016/j.envpol.2017.02.026.
2. Shammi, M.; Rahman, M.M.; Bondad, S.E.; Bodrud-Doza, M. Impacts of Salinity Intrusion in Community Health: A Review of Experiences on Drinking Water Sodium from Coastal Areas of Bangladesh. *Healthcare (Basel)* 2019, 7, doi:10.3390/healthcare7010050.
3. Huang, L.; Wu, H.; van der Kuijp, T.J. The health effects of exposure to arsenic-contaminated drinking water: a review by global geographical distribution. *Int J Environ Health Res* 2015, 25, 432-452, doi:10.1080/09603123.2014.958139.
4. Ding, S.; Deng, Y.; Bond, T.; Fang, C.; Cao, Z.; Chu, W. Disinfection byproduct formation during drinking water treatment and distribution: A review of unintended effects of engineering agents and materials. *Water Res* 2019, 160, 313-329, doi:10.1016/j.watres.2019.05.024.
5. Iyare, P.U. The effects of manganese exposure from drinking water on school-age children: A systematic review. *Neurotoxicology* 2019, 73, 1-7, doi:10.1016/j.neuro.2019.02.013.
6. Novotna, K.; Cermakova, L.; Pivokonska, L.; Cajthaml, T.; Pivokonsky, M. Microplastics in drinking water treatment - Current knowledge and research needs. *Sci Total Environ* 2019, 667, 730-740, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.02.431.
7. Domingo, J.L.; Nadal, M. Human exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) through drinking water: A review of the recent scientific literature. *Environ Res* 2019, 177, 108648, doi:10.1016/j.envres.2019.108648.
8. Ashton, J. Water is the staff of life and at the heart of public health. *J R Soc Med* 2019, 112, 516-518, doi:10.1177/0141076819892912.
9. Allaire, M.; Mackay, T.; Zheng, S.; Lall, U. Detecting community response to water quality violations using bottled water sales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2019, 116, 20917-20922, doi:10.1073/pnas.1905385116.
10. Wang, M.H.; He, Y.; Sen, B. Research and management of plastic pollution in coastal environments of China. *Environ Pollut* 2019, 248, 898-905, doi:10.1016/j.envpol.2019.02.098.
11. Zuccarello, P.; Ferrante, M.; Cristaldi, A.; Copat, C.; Grasso, A.; Sangregorio, D.; Fiore, M.; Oliveri Conti, G. Exposure to microplastics (<10µm) associated to plastic bottles mineral water consumption: The first quantitative study. *Water Res* 2019, 157, 365-371, doi:10.1016/j.watres.2019.03.091.
12. Park, E.J.; Han, J.S.; Park, E.J.; Seong, E.; Lee, G.H.; Kim, D.W.; Son, H.Y.; Han, H.Y.; Lee, B.S. Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible implications on reproduction and development of the next generation. *Toxicology letters* 2020, 324, 75-85, doi:10.1016/j.toxlet.2020.01.008.
13. de-Magistris, T. Nutrition, Choice and Health-Related Claims. *Nutrients* 2020, 12, doi:10.3390/nu12030650.
14. Bielefeldt, A.R.; Kowalski, K.; Schilling, C.; Schreier, S.; Kohler, A.; Scott Summers, R. Removal of virus to protozoan sized particles in point-of-use ceramic water filters. *Water Res* 2010, 44, 1482-1488, doi:10.1016/j.watres.2009.10.043.
15. Albergamo, V.; Blankert, B.; Cornelissen, E.R.; Hofs, B.; Knibbe, W.J.; van der Meer, W.; de Voogt, P. Removal of polar organic micropollutants by pilot-scale reverse osmosis drinking water treatment. *Water Res* 2019, 148, 535-545, doi:10.1016/j.watres.2018.09.029.
16. Buzalaf, M.A.; Levy, F.M.; Rodrigues, M.H.; Bastos, J.R. Effect of domestic water filters on water fluoride content and level of the public water supply in Bauru, Brazil. *Journal of dentistry for children* 2003, 70, 226-230.
17. Tanaka, Y.; Saihara, Y.; Izumotani, K.; Nakamura, H. Daily ingestion of alkaline electrolyzed water containing hydrogen influences human health, including gastrointestinal symptoms. *Medical gas research* 2018, 8, 160-166, doi:10.4103/2045-9912.248267.
18. Fenton, T.R.; Huang, T. Systematic review of the association between dietary acid load, alkaline water and cancer. *BMJ open* 2016, 6, e010438, doi:10.1136/bmjopen-2015-010438.
19. Al Zahrani, S.M.; Omar, U.M.; Rahimuddin, S.A.; Al-Ghafari, A.B.; Aldahlawi, A.M.; Al Doghather, H.A. Antiproliferative and apoptotic effects of the natural alkaline water (Zamzam) in breast cancer cell line MCF-7. *Journal of cancer research and therapeutics* 2019, 15, 1098-1104, doi:10.4103/jert.JCRT\_381\_17.
20. Zambrano, A.; Garcia-Carpizo, V.; Gallardo, M.E.; Villamuera, R.; Gomez-Ferreria, M.A.; Pascual, A.; Buisine, N.; Sachs, L.M.; Garesse, R.; Aranda, A. The thyroid hormone receptor beta induces DNA damage and premature senescence. *J Cell Biol* 2014, 204, 129-146, doi:10.1083/jcb.201305084.

21. Monsalve, M.; Wu, Z.; Adelmant, G.; Puigserver, P.; Fan, M.; Spiegelman, B.M. Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1. *Mol Cell* 2000, 6, 307-316.
22. Paduch, R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cellular oncology* 2016, 39, 397-410, doi:10.1007/s13402-016-0281-9.
23. Blazejczyk, A.; Papiernik, D.; Porshneva, K.; Sadowska, J.; Wietrzyk, J. Endothelium and cancer metastasis: Perspectives for antimetastatic therapy. *Pharmacological reports : PR* 2015, 67, 711-718, doi:10.1016/j.pharep.2015.05.014.
24. Cantelmo, A.R.; Conradi, L.C.; Brajic, A.; Goveia, J.; Kalucka, J.; Pircher, A.; Chaturvedi, P.; Hol, J.; Thienpont, B.; Teuwen, L.A., et al. Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer cell* 2016, 30, 968-985, doi:10.1016/j.ccell.2016.10.006.
25. Garcia-Quintans, N.; Sanchez-Ramos, C.; Prieto, I.; Tierrez, A.; Arza, E.; Alfranca, A.; Redondo, J.M.; Monsalve, M. Oxidative stress induces loss of pericyte coverage and vascular instability in PGC-1alpha-deficient mice. *Angiogenesis* 2016, 19, 217-228, doi:10.1007/s10456-016-9502-0.
26. Follain, G.; Osmani, N.; Azevedo, A.S.; Allio, G.; Mercier, L.; Karreman, M.A.; Solecki, G.; Garcia Leon, M.J.; Lefebvre, O.; Fekonja, N., et al. Hemodynamic Forces Tune the Arrest, Adhesion, and Extravasation of Circulating Tumor Cells. *Developmental cell* 2018, 45, 33-52 e12, doi:10.1016/j.devcel.2018.02.015.
27. Morote, Á.-F.O., J.; Hernández, M. The Use of Non-Conventional Water Resources as a Means of Adaptation to Drought and Climate Change in Semi-Arid Regions: South-Eastern Spain. *Water Res* 2019, 11.
28. Wu, D.; Zhou, Y.; Lu, G.; Hu, K.; Yao, J.; Shen, X.; Wei, L. The Occurrence and Risks of Selected Emerging Pollutants in Drinking Water Source Areas in Henan, China. *International journal of environmental research and public health* 2019, 16, doi:10.3390/ijerph16214109.
29. Doria, M.F. Bottled water versus tap water: understanding consumers' preferences. *Journal of water and health* 2006, 4, 271-276.
30. Perez-Vidal, A.; Diaz-Gomez, J.; Castellanos-Rozo, J.; Usaquen-Perilla, O.L. Long-term evaluation of the performance of four point-of-use water filters. *Water Res* 2016, 98, 176-182, doi:10.1016/j.watres.2016.04.016.
31. Shin, D.W.; Yoon, H.; Kim, H.S.; Choi, Y.J.; Shin, C.M.; Park, Y.S.; Kim, N.; Lee, D.H. Effects of Alkaline-Reduced Drinking Water on Irritable Bowel Syndrome with Diarrhea: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Pilot Study. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2018, 2018, 9147914, doi:10.1155/2018/9147914.
32. Chycki, J.; Kurylas, A.; Maszczyk, A.; Golas, A.; Zajac, A. Alkaline water improves exercise-induced metabolic acidosis and enhances anaerobic exercise performance in combat sport athletes. *PloS one* 2018, 13, e0205708, doi:10.1371/journal.pone.0205708.
33. Weinsheim, T.; Lesser, H.; Sataloff, R.T. Unforeseen consequence of alkaline water therapy for laryngopharyngeal reflux. *Ear, nose, & throat journal* 2018, 97, 394-395, doi:10.1177/014556131809701207.
34. Kerschbaum, E.; Nussler, V. Cancer Prevention with Nutrition and Lifestyle. *Visceral medicine* 2019, 35, 204-209, doi:10.1159/000501776.
35. Solheim, T.S.; Vagnildhaug, O.M.; Laird, B.J.; Balstad, T.R. Combining optimal nutrition and exercise in a multimodal approach for patients with active cancer and risk for losing weight: Rationale and practical approach. *Nutrition* 2019, 67-68, 110541, doi:10.1016/j.nut.2019.06.022.
36. Tsuji, J.S.; Chang, E.T.; Gentry, P.R.; Clewell, H.J.; Boffetta, P.; Cohen, S.M. Dose-response for assessing the cancer risk of inorganic arsenic in drinking water: the scientific basis for use of a threshold approach. *Critical reviews in toxicology* 2019, 49, 36-84, doi:10.1080/10408444.2019.1573804.