

## **Evaluación de los potenciales efectos beneficiosos del consumo de agua alcalinizada sobre la vasculatura en ratas hipertensas.**

Raquel García-Gómez<sup>1</sup>, Sara Amor<sup>2</sup>, Gaurangkumar Patel<sup>1</sup>, María de la Fuente Fernández<sup>2</sup>, Miriam Granado<sup>2</sup>, María Monsalve<sup>1,\*</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM). Calle Arturo Duperier nº 4. 28029-Madrid (España).

<sup>2</sup> Dept. Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Calle Arzobispo Morcillo nº 2. 28029-Madrid (España).

\*Las consultas deben ser dirigidas a María Monsalve: [mpmonsalve@iib.uam.es](mailto:mpmonsalve@iib.uam.es)

### **Resumen**

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. Por ello realizamos un primer estudio para valorar los efectos de la ingesta regular de agua alcalina frente al agua del grifo en el desarrollo de tumores utilizando modelos de ratón. La conclusión principal del estudio fue que el consumo regular de agua alcalinizada en ratones preservaba mejor la estructura vascular y posiblemente por ello, la formación de metástasis estaba reducida en el modelo testado. Por ello decidimos evaluar más directamente los efectos vasculares del agua alcalina se probaron en un modelo de hipertensión en ratas (SHR) y se encontró que después de 12 semanas de consumo de agua alcalina, los anillos aórticos tenían una respuesta vasodilatadora mejorada a un donante de óxido nítrico (NTP) y varios factores inflamatorios. los marcadores se redujeron en la sangre y en el tejido del corazón. En general, nuestros resultados indican que el agua alcalina podría tener un efecto relevante en la preservación de la función vascular y reducir la inflamación crónica sistémica de bajo grado, y que estos efectos podrían, en el contexto de un enfermo hipertenso, mejorar la respuesta vasodilatadora mediada por el óxido nítrico.

### **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 un estudio previo, 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. Los resultados obtenidos indicaron 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 estructura y funcionalidad vascular y, lo que podría tener un impacto positivo en la incidencia de metástasis. Por ello decidimos evaluar directamente el efecto del consumo regular de agua alcalinizada en un modelo de enfermedad vascular, como son las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y su control las ratas Wistar Kyoto (WKY).

## Materiales y Metodos

*Ratas* En este estudio se utilizaron ratas macho Wistar Kyoto (WYK) y ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Los animales fueron criados y alojados en el Animalario de la Facultad de Medicina de la UAM. Los protocolos de experimentación animal fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal y la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (PROEX 221/19). 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, las ratas de 6 semanas de edad se dividieron en dos grupos experimentales: a un grupo se le dio acceso libre al agua del grifo (sin filtrar, no esterilizada) disponible en el Instituto, y a un segundo grupo se le dio la misma agua que había previamente filtrada con 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 tratamiento. Cada grupo experimental incluyó 6 animales. El aumento de peso y la presión arterial sistólica se controlaron cada 2 semanas.

Las mediciones de la presión arterial media (PAM) se realizaron cada dos semanas mediante pletismografía del manguito de la cola utilizando un sistema de presión arterial Niprem 645 (Cibertec, Madrid, España). Para ello, las ratas se colocaron en una zona tranquila ( $22 \pm 2$  ° C) y se habituaron a las condiciones experimentales. Antes de las mediciones, las ratas se precalentaron a 34 ° C durante 10-15 min. Luego, se colocó el manguito de oclusión en la base de la cola y el manguito del sensor se colocó junto al manguito de oclusión. A continuación, se infló el manguito de oclusión a 250 mm Hg y se desinfló durante 20 s. Se registraron de cinco a seis mediciones en cada ratón y se calculó la media de todas las mediciones cada día por animal.

Las ratas se sacrificaron por decapitación después de una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg / kg). Se recogió sangre y se separaron el plasma y las PBMC utilizando un gradiente de Ficoll.

*Reactividad vascular.* Después del sacrificio, se recogieron las aortas y se cortaron en segmentos de 2 mm. Cada segmento se preparó para el registro de tensión isométrica en un baño de órganos de 4 ml, como se describió anteriormente [20].

En resumen, el baño de órganos que contiene la solución modificada de Krebs-Henseleit (KHB) a 37 ° C (mM): NaCl, 115; KCl, 4.6; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25; glucosa, 11. La solución se equilibró con 95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono a un pH 7.3-7.4. Se pasaron dos alambres de acero finos (100 µm de diámetro) a través del lumen del segmento vascular; un cable se fijó a la pared del baño de órganos y el otro se conectó a un medidor de tensión para el registro de tensión isométrica (Universal Transducing Cell UC3 y Statham Microscale Accessory UL5; Statham Instruments, Inc, Oxnard, CA, EE. UU.). Esta disposición permite la aplicación de tensión pasiva en un plano

perpendicular al eje longitudinal del cilindro vascular. Los cambios en la fuerza isométrica se registraron utilizando un sistema de adquisición de datos Power Lab (AD Instruments). Se aplicó una tensión pasiva óptima de 1 g a los segmentos vasculares y luego se dejaron equilibrar durante 60-90 min. Antes de comenzar el experimento, se estimularon los segmentos vasculares con cloruro de potasio (100 mM) para determinar la contractilidad del músculo liso. Se descartaron todos los segmentos que no consiguieron contraerse al menos 0.5 g. A continuación, los segmentos se lavaron con solución de KHB modificada nueva y se dejaron estabilizar.

Una vez estabilizada, la respuesta a las dosis acumuladas de los agentes vasoconectores ET-1 (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-7</sup> M) (Sigma-Aldrich) y Ang-II (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-6</sup> M) (Sigma-Aldrich) fue grabado. La respuesta a la contracción se evaluó como el porcentaje de la contracción producida en respuesta a KCl 100 mM (respuesta máxima).

Para evaluar la respuesta a los agentes vasorrelajantes, los segmentos estabilizados fueron pre-contráidos con U46619 (10<sup>-8</sup> M a 10<sup>-6</sup>M) un análogo estable del tromboxano A2 (Sigma-Aldrich) y cuando la contracción alcanzó un nivel estable, se estimuló la respuesta vasodilatadora con dosis crecientes de ACh (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-4</sup> M) (Sigma-Aldrich) y NTP (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-5</sup> M) (Sigma-Aldrich). La respuesta de relajación se evaluó como el porcentaje del tono activo medido tras la exposición a NTP 10<sup>-5</sup> M (respuesta máxima).

*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, desparafiraron 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).

*Extracción de proteínas y Western Blot (WB).* Se prepararon extractos de células enteras como se describió anteriormente [22]. Las proteínas se separaron usando geles SDS-PAGE al 10-12% 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) Antibody (Alpha Diagnostic Int.), iNOS (PA5-16524, Invitrogen), IL-1β (H-153, Santa Cruz Biotechnology Inc.). 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 de expresión genética.* Las muestras de tejido cardíaco se homogeneizaron en presencia de 1 ml de reactivo Trizol™ y se aisló el ARN total siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir de preparaciones de ARN total mediante transcripción inversa de 1 µg de ARN utilizando la transcriptasa inversa de MMV, en un volumen final de 20 µl, como se describió anteriormente [23]. La mezcla se incubó a 37°C durante 45 min y luego se enfrió durante 2 min a 4°C. el ADNc resultante se utilizó como molde para la qPCR posterior. Los cebadores utilizados se indicant a continuación. Cada

reacción de PCR de 10  $\mu$ l incluyó 1  $\mu$ l de ADNc, 5  $\mu$ l de qPCR Mastermix (Cultek, Dutscher Group) y cebadores (0,3  $\mu$ M). Las muestras se analizaron por triplicado en un Mastercycler® RealPlex2, Eppendorf). Se usó  $\beta$ -actina como control de carga.

TNF $\alpha$  Directo 5'-ATGGGCTCCCTCTCATCAGT-3'  
 TNF $\alpha$  Reverso 5'-CAAGGGCTCTTGATGGCAGA-3'  
 TGF- $\beta$  Directo 5'-CTGTACGCTGTCAGGCTCTC-3'  
 TGF- $\beta$  Reverso 5'-CCAGGTGGAAGTTCTGCGAT-3'  
 iNOS Directo 5'-TGCACAGAATGTTCCAGAATCCC-3'  
 iNOS Reverso 5'-TTGGACTTGCAAGAGATATCCG-3'  
 IL-1 $\beta$  Directo 5'-GCCAACAAGTGGTATTCTCCATGAGC-3'  
 IL-1 $\beta$  Reverso 5'-TTGTCACCCCGGATGGAATG-3'  
 IL-10 Reverso 5'-TTGTCACCCCGGATGGAATG-3'  
 IL-10 Directo 5'-GCTCAGCACTGCTATGTTGC-3'  
 Arg-1 Reverso 5'-GTAGCCGGGTGAATACTGG-3'  
 Arg-1 Directo 5'-GGACATCGTGTACATCGGCT-3'  
 IL-6 Reverso 5'-TGAAGTCTCCTCTCCGGACTT-3'  
 IL-6 Directo 5'-GAGACTTCCAGCCAGTTGCC-3'  
 IL-4 Reverso 5'-TCATTCACGGTGCAGCTTCT-3'  
 IL-4 Directo 5'-TCCACGGATGTAACGACAGC-3'  
 IF $\gamma$  Reverso 5'-ACACGTTCTGGTGCTTCCAA-3'  
 IF $\gamma$  Directo 5'-CGGGAGTGGAGCTTTGATGA-3'

*ELISA.* Los niveles circulantes de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  se analizaron en muestras de plasma utilizando kits de prueba ELISA (RAB0480-1K, RAB0311-1KT, RAB0278-1KT de Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores se estandarizaron a los niveles de proteína plasmática total.

*REDOX.* La capacidad antioxidante se midió en muestras de plasma utilizando el sistema electroquímico e-BQC (BioQuoChem). Los valores se estandarizaron a los niveles de proteína plasmática total.

*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  $p < 0,05$ .

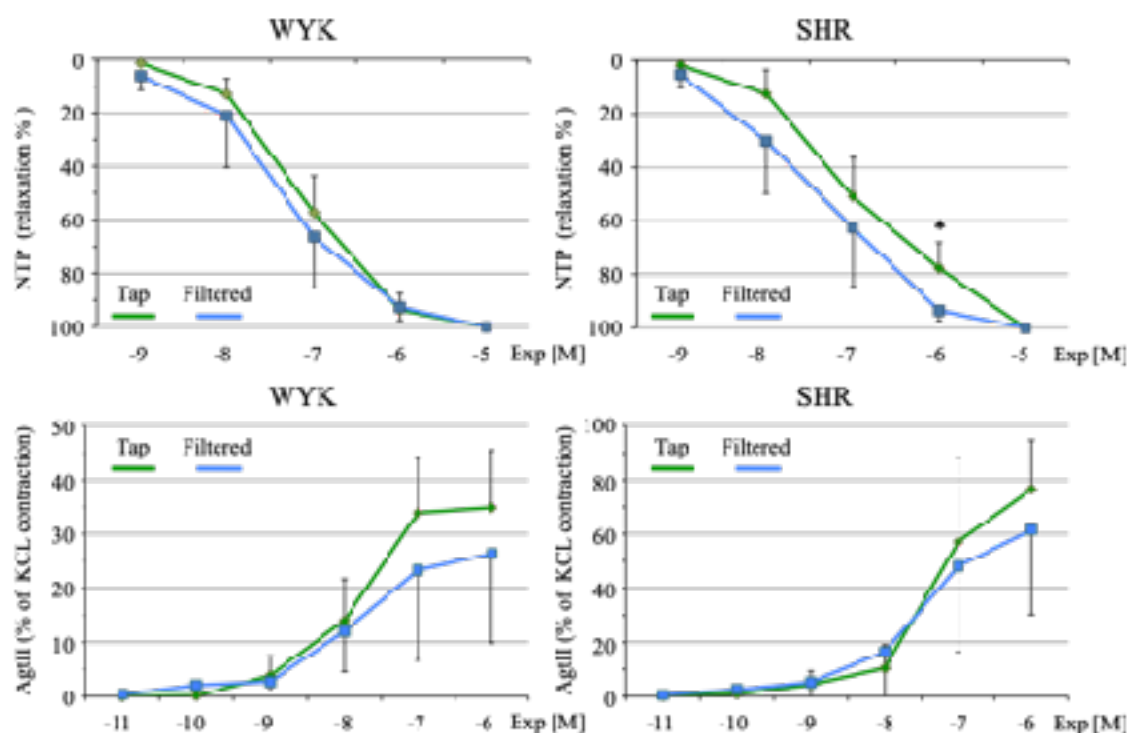
## Resultados and Discusión

### Función vascular

Para evaluar directamente el impacto de la ingesta de agua alcalina en la vasculatura, decidimos probar su efecto en un modelo bien establecido de hipertensión, ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y su control normotenso, las ratas Wistar Kyoto (WKY). Se expusieron ratas SHR y WKY desde el destete a agua corriente de grifo o agua alcalina filtrada durante 12 semanas. Durante este período, se controló el peso de las ratas y la presión arterial media cada dos semanas. Descubrimos que las ratas SHR tratadas con agua filtrada habían ganado significativamente más peso que las tratadas con el agua del grifo a las 4 y 6 semanas de tratamiento, pero estas diferencias ya no resultaron significativas a las 8 semanas de tratamiento. No se encontraron diferencias significativas de peso entre los grupos en el caso de las ratas WKY (Sup. Fig. 1A). La presión arterial media aumentó de 4 a 12 semanas de tratamiento tanto en ratas SHR

como WKY, pero no se encontraron diferencias significativas entre ratas que tomaban agua del grifo o agua alcalina filtrada (Sup. Fig. 1B).

Luego evaluamos la reactividad vascular en anillos de aorta, primero probamos la respuesta vasodilatadora en respuesta al óxido nítrico utilizando dosis crecientes del NTP como donante de NO en anillos previamente hipercontraídos. La relajación independiente del endotelio en respuesta a NTP provocó una respuesta vasodilatadora más pronunciada en ratas WYK y SHR tratadas con agua filtrada, alcanzando las diferencias de las medias medias significación estadística a  $10^{-6}$  M NTP en ratas SHR (Fig. 1). La relajación dependiente del endotelio se determinó sometiendo los segmentos aórticos hipercontraídos a curvas de dosis-respuesta de ACh, pero no pudieron identificarse diferencias significativas (Sup. Fig. 2).



**Fig. 1:** Reactividad vascular de anillos aórticos de ratas WYK y SHR tratadas con agua del grifo o filtrada durante 12 w. Paneles superiores, respuesta vasodilatadora a dosis crecientes de NTP. Paneles inferiores, vasoconstricción en respuesta a dosis crecientes de AgtII. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0.05$ .

La mejora en la respuesta a NTP también podría estar asociada con una reducción de la contracción de las células del músculo liso a los vasoconstrictores. Por lo tanto, a continuación probamos en plataformas aórticas completamente dilatadas la respuesta a AgtII (Fig.4) Se observó una tendencia general a una contracción más baja en respuesta a AgtII para las ratas WYK y SHR del grupo de agua alcalina, pero las diferencias no alcanzaron significación estadística. Se encontraron resultados similares para la respuesta a ET-1 (Sup. Fig. 2).

Dado que la hipertensión generalmente se asocia con un estado de inflamación crónica de bajo grado, estudiamos el estado inflamatorio en las ratas analizando los

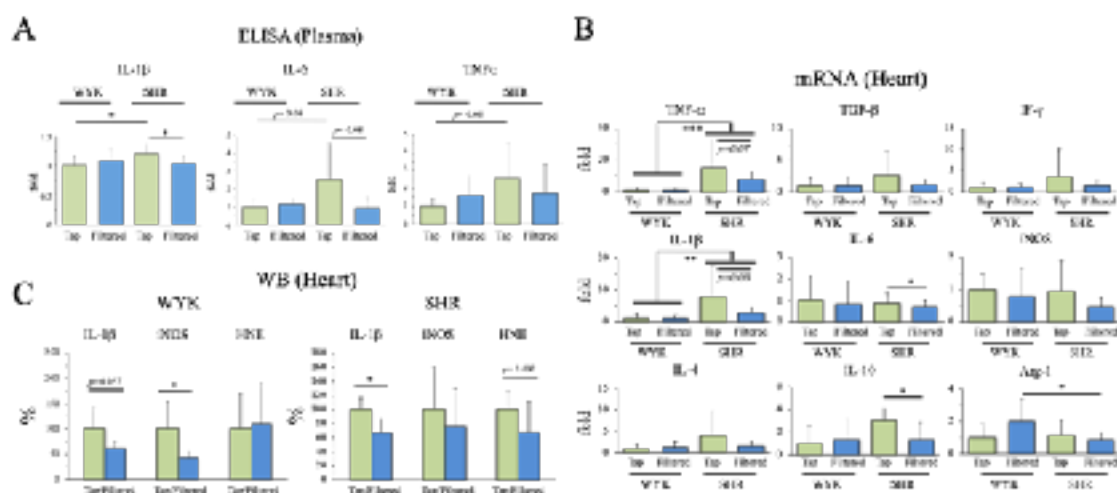
niveles circulantes de tres citocinas proinflamatorias, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ . En línea con estudios anteriores, las ratas SHR mostraron niveles más altos de las tres citosinas y en el caso de nuestro estudio, estas diferencias alcanzaron significación estadística para IL-1 $\beta$ . El consumo de agua alcalina resultó en la reducción de los niveles de todas las citocinas probadas en ratas SHR, alcanzando significancia estadística para IL-1 $\beta$ . Por el contrario, en ratas WKY, el agua alcalina no alteró significativamente los niveles de estas citocinas (Fig. 2A).

Teniendo en cuenta que se ha propuesto el tratamiento con agua alcalina como estrategia para mejorar el equilibrio redox sistémico y el impacto de la inflamación en el estado redox, decidimos evaluar la capacidad antioxidante en muestras de plasma de rata tomadas en el momento del sacrificio (12 semanas de tratamiento). Para ello, utilizamos el sistema electroquímico e-BQC que distingue entre antioxidantes rápidos-Q1 como la vitamina C y lentos-Q2, como los polifenoles. Encontramos que, en ratas WKY, el agua alcalina filtrada no altera significativamente la capacidad antioxidante en el plasma. En contraste, en SHR, el agua alcalina disminuyó significativamente la capacidad antioxidante detectable en plasma. Esta disminución fue significativa para los antioxidantes rápidos (Q1), los antioxidantes lentos (Q2) o su combinación (QT) (Sup. Fig. 3).

Para determinar la significancia de estos resultados, analizamos los niveles de expresión génica de varios mediadores inflamatorios en el corazón, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, iNOS y Arg-1. De acuerdo con estudios anteriores, observamos una tendencia general a niveles más altos en SHR que en WKY, que para nuestro estudio alcanzó significación estadística para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . El consumo de agua alcalina no alteró significativamente los niveles de ninguno de los ARNm analizados en ratas WKY mientras que en las ratas SHR si se observó una disminución general en la expresión de todos los genes inflamatorios analizadas, pero las diferencias solo alcanzaron significación estadística para IL-6 e IL-10 (Fig. 2B).

Con el objetivo de validar la relevancia de estos resultados, determinamos los niveles de pro-IL-1 $\beta$  e iNOS mediante Western Blot en tejido cardíaco. Encontramos que el consumo de agua alcalina redujo significativamente los niveles de iNOS en WKY y de pro-IL-1 $\beta$  en SHR (Fig. 2C).

Dado que la inflamación reducida se asocia normalmente con niveles reducidos de oxidantes, evaluamos el estado oxidativo del tejido cardíaco analizando mediante Western Blot la presencia de proteínas modificadas con HNE, pero el consumo de agua alcalina no resultó en una reducción significativa en la formación de aductos de HNE en ratas WKY ni SHR (Fig. 2C).



**Fig. 2:** Perfil inflamatorio en ratas WYK y SHR tratadas con agua del grifo o filtrada durante 12 w. (a) Análisis ELISA de citocinas inflamatorias en muestras de plasma. (b) Análisis qRT-PCR de genes inflamatorios en muestras de tejido cardíaco. (c) Análisis por Western Blot de proteínas modificadas por HNE, pro-IL-1 $\beta$  e iNOS y en muestras de tejido cardíaco. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0,05$ .

En resumen, estos datos sugieren que el tratamiento con agua alcalina en las ratas llevó a una reducción en los niveles de mediadores inflamatorios y podrían indicar un nivel general reducido de inflamación, especialmente en ratas hipertensas.

## Discusión

El cambio climático global está reduciendo significativamente la precipitación media anual de agua de lluvia en países como España [29] y tiene un impacto negativo en la calidad del agua del grifo de los suministros municipales [30]. De hecho, la creciente preocupación por la calidad del agua del grifo ha aumentado el uso doméstico tanto de agua embotellada [31] como de sistemas de filtración o purificación de agua en el lugar de uso [32]. 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 [17,33], con resultados controvertidos [34], 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 [35]. 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 [37]. Los estudios que se centran en el agua en este contexto son comparativamente raros [36][38]. 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.

Cuando 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.

Concluimos que, la evaluación del efecto del agua alcalina en el desarrollo de tumores utilizando tres modelos de ratón complementarios, para el inicio, el desarrollo de tumores primarios y la metástasis, sugiere que la diferencia más evidente y significativa entre los animales que ingieren agua del grifo y agua alcalina se encuentra en la vasculatura. Si bien los tumores alteran la estabilidad vascular en animales que beben agua alcalina, las estructuras vasculares parecían estar mejor conservadas, con un engrosamiento reducido de la capa media, una mejor cobertura endotelial y una tortuosidad reducida, características que podrían ser la causa subyacente de la formación reducida observada de ganglios metastásicos. En vista de estos resultados, decidimos probar más directamente el impacto del consumo de agua alcalina en la vasculatura.

Con ese fin, usamos un modelo de rata de hipertensión espontánea y tratamos a estas ratas y sus controles normotensos por 12 con agua alcalina o del grifo. Encontramos que el consumo de agua alcalina mejoró la respuesta vasodilatadora al óxido nítrico en ratas hipertensas, y este cambio se asoció con la reducción de algunos marcadores inflamatorios, en particular los niveles circulantes de IL-1 $\beta$ , los niveles de ARNm de IL-6 e IL-10 en el corazón, y los niveles de proteína de pro-IL-1 $\beta$  también en el corazón, respaldando la noción de que el consumo de agua alcalina podría tener algunos efectos beneficiosos sobre la hipertensión que están asociados con una mejor respuesta vasodilatadora y una reducción de la inflamación.

## **Conclusions**

Los efectos en la salud humana derivados del consumo regular de agua alcalina siguen siendo motivo de controversia, en gran parte debido a la falta de estudios científicos relevantes que los evalúen. Originalmente desarrollado como un tratamiento complementario para la acidosis disipéptica, se ha presumido que tiene efectos beneficiosos para otras condiciones, con afirmaciones que carecen de una base científica para sustentarlos. En vista del interés general sobre sus posibles beneficios, es necesario por tanto evaluar adecuadamente hasta dónde llega su impacto en la salud humana.

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 vasculares y el sistema inmunológico. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no permiten aún proponer los posibles mecanismos moleculares involucrados. Sin embargo, quizás no sea sorprendente que las células vasculares y las células inmunitarias que están directamente expuestas al torrente sanguíneo estén particularmente influenciadas por el agua que beben los animales. De manera similar, es probable que el epitelio intestinal se vea fuertemente influenciado como se ha observado para la exposición a 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.

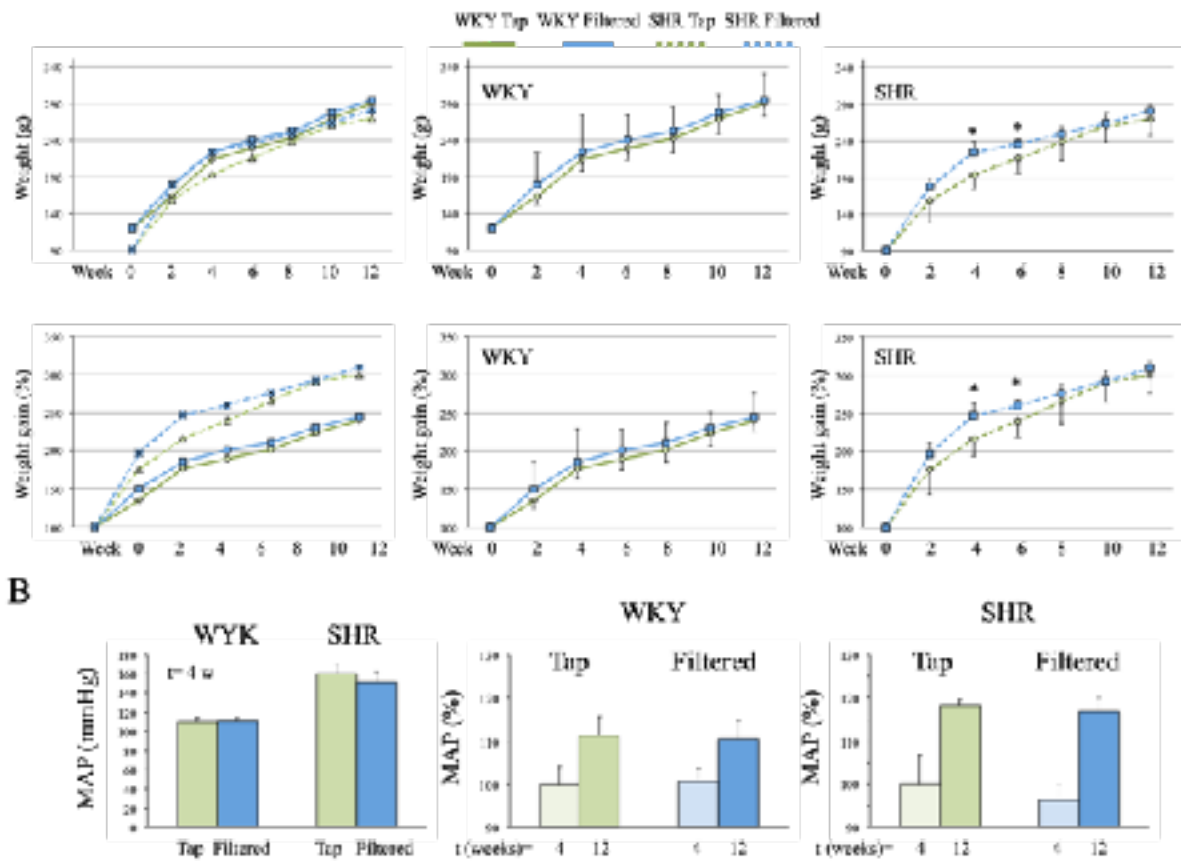
### **Conflictos de Interés**

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

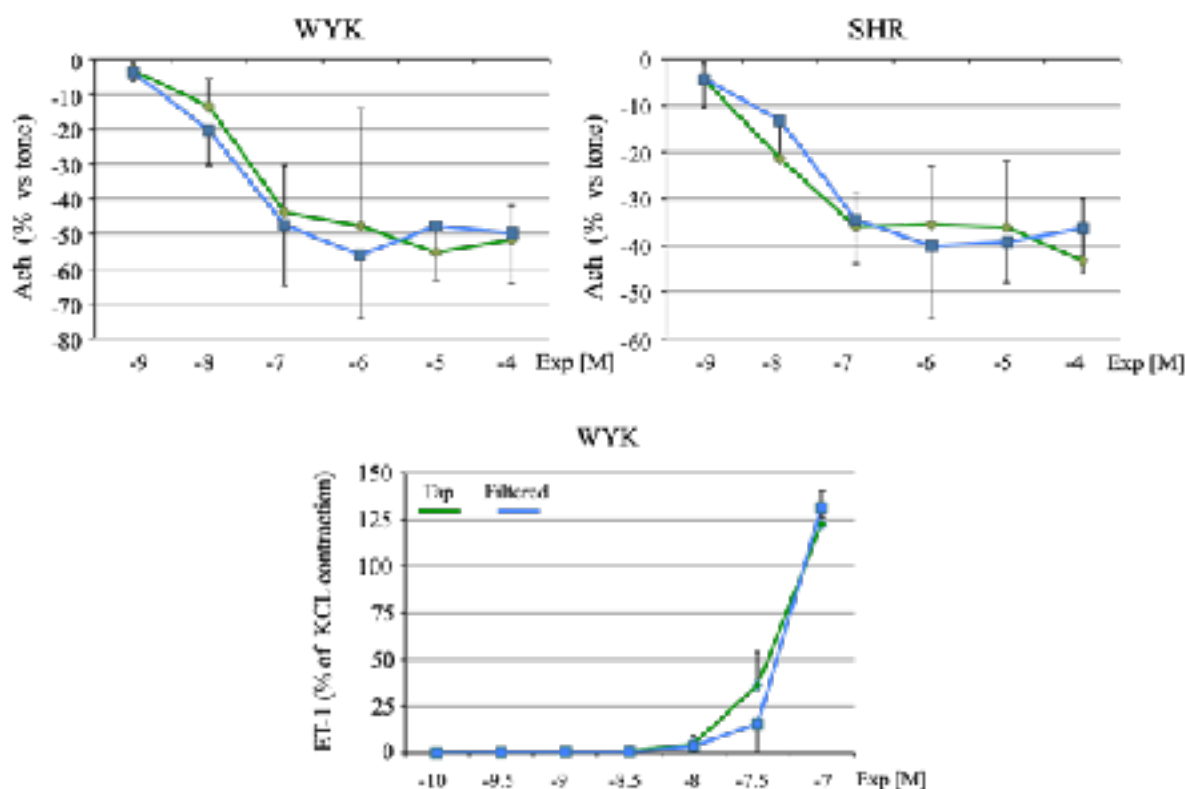
### **Financiación**

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.

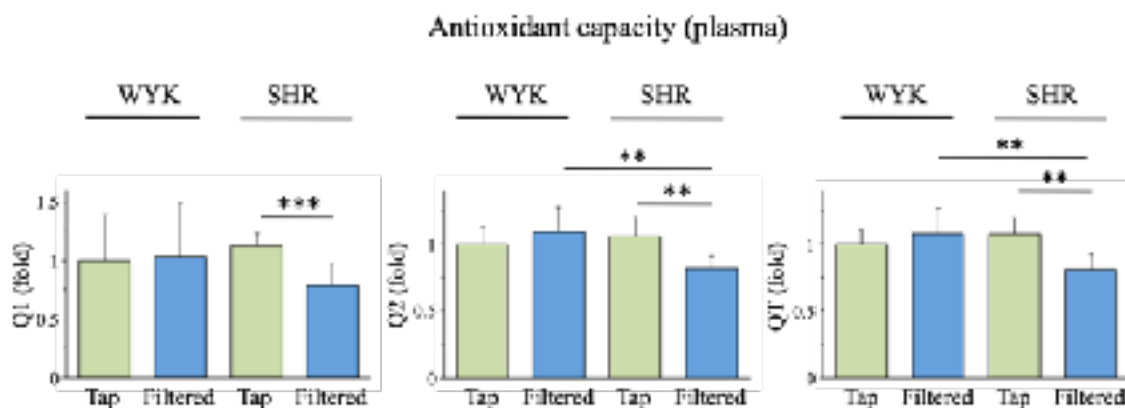
Material Suplementario



**Supp. Fig. 1:** Ratas WKY y SHR tratadas con agua del grifo o filtrada. (a) Aumento de peso durante el período de tratamiento de 12 semanas evaluado cada 2 semanas. Panel izquierdo gráfico todos los grupos incluyendo valores medios. En los paneles central y derecho, los datos son la media  $\pm$  desviación estándar. Valores absolutos de los paneles superiores, paneles inferiores relativos a valores  $t = 0$  estandarizados como 100%. (b) Presión arterial sistólica, panel izquierdo a las 4 semanas de tratamiento, paneles derechos que comparan los datos a las 4 y 12 semanas de tratamiento. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar \*,  $p < 0.05$ .



**Supp. Fig. 2:** Los anillos aórticos de ratas WYK y SHR tratadas con agua del grifo o filtrada durante 12 w. Paneles superiores, respuesta vasodilatadora a dosis crecientes de ACh. Paneles inferiores, vasoconstricción en respuesta a dosis crecientes de ET-1. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar. \*,  $p < 0.05$ .



**Supp. Fig. 3:** Ratas WKY y SHR tratadas con agua del grifo o filtrada. Evaluación electroquímica de la capacidad antioxidante total (QT), rápida (Q1) y lenta (Q2) en muestras de plasma. Los datos son media  $\pm$  desviación estándar \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.005$ .

## 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.; Rahimulddin, 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/jcrt.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.