



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**SEDE SUR**

**Departamento de Farmacobiología**

**“Estudio de la modulación del H<sub>2</sub>S sobre la  
actividad del bulbo olfatorio en condiciones  
de normoxia e hipoxia”**

**T E S I S**

Que presenta

**Adrián Arellano Razo**

Para Obtener el Grado de

**Maestro en Ciencias en Neurofarmacología y  
Terapéutica Experimental**

Directores de la Tesis:

**Dr. David Centurión Pacheco**

**Dr. Fernando Peña Ortega**

Ciudad de México

Octubre, 2020

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio No. 6 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, bajo la dirección del Dr. David Centurión Pacheco y en el laboratorio C0-1 de Circuitos Neuronales del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, bajo la dirección del Dr. José Fernando Peña Ortega.

El proyecto fue financiado por: (1) CONACyT con los proyectos número CB-252702 (responsable técnico: Dr. David Centurión Pacheco) y A1-S-7540 (responsable técnico: Dr. José Fernando Peña Ortega), y (2) la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN202018; responsable técnico: Dr. José Fernando Peña Ortega).

Asimismo, durante la realización del trabajo se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca de Maestría No. 718742.



*Hijo mío, si recibieres mis palabras,  
Y mis mandamientos guardares dentro de ti,  
Haciendo estar atento tu oído a la sabiduría;  
Si inclinares tu corazón a la prudencia,  
Si clamares a la inteligencia,  
Y a la prudencia dieres tu voz;  
Si como a la plata la buscares,  
Y la escudriñares como a tesoros,  
Entonces entenderás el temor de Jehová,  
Y hallarás el conocimiento de Dios.*

## Agradecimientos

Quiero plasmar por escrito mi más sincero y profundo agradecimiento a todas las personas que me han apoyado y me han impulsado a seguir adelante. Agradezco los consejos, la asesoría, la paciencia y el espacio brindado tanto por el Dr. David Centurión como por el Dr. Fernando Peña. También, agradezco la enseñanza asesoría técnica y consejos brindados por parte de la Dra. Aracely Sánchez y del Dr. Benito Ordaz. Además, deseo expresar mis agradecimientos a los integrantes del laboratorio C0-1 y laboratorio 6 por su compañerismo, recibimiento y los buenos momentos que pasamos.

# Índice

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
<b>El sulfuro de hidrógeno</b>	<b>12</b>
<b>Historia del sulfuro de hidrógeno</b>	<b>14</b>
<b>Propiedades químicas del H<sub>2</sub>S</b>	<b>16</b>
<b>Efectos del H<sub>2</sub>S en SNC.</b>	<b>17</b>
Efectos del H <sub>2</sub> S en proteínas de señalización intracelular	17
Efectos del H <sub>2</sub> S en canales iónicos	18
Regulación del H <sub>2</sub> S sobre sistemas neurotransmisores	20
El H <sub>2</sub> S como sensor de oxígeno	20
<b>Sistema olfatorio</b>	<b>24</b>
Bulbo olfatorio	25
Oscilaciones neuronales y actividad poblacional del bulbo olfatorio	27
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>31</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>31</b>

<b>OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>General</b>	<b>31</b>
<b>Específicos</b>	<b>31</b>
<b>Protocolo experimental</b>	<b>32</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>32</b>
<b>Animales</b>	<b>32</b>
<b>Obtención de las rebanadas de bulbo olfatorio</b>	<b>33</b>
<b>Registros electrofisiológicos</b>	<b>33</b>
Actividad espontánea poblacional	33
<b>ANÁLISIS</b>	<b>35</b>
Estadística	35
Frecuencias fundamentales	35
<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>62</b>

## Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMPC	Monofosfato Cíclico de Adenosina (por sus siglas en inglés)
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
CBS	Cistationina Beta Sintetasa
CO	Monóxido de carbono
CSE	Cistationina Gama Liasa
ERO	Especies reactivas de oxígeno
H <sub>2</sub> S	Sulfuro de Hidrógeno
HO-2	Hemo-Oxigenasa-2
HS <sup>-</sup>	Ion sulfhidrato
i.p.	Administración intraperitoneal
KATP	Canales de K <sup>+</sup> sensibles a ATP
KCa <sub>2</sub>	Canales de K <sup>+</sup> sensibles a calcio
KCl	Cloruro de potasio
LCRa	Líquido cefalorraquídeo artificial
LTP	Potenciación a largo plazo (por sus siglas en inglés)
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
mM	Milimolar

MST	3-mercaptopiruvato sulfuro-transferasa
Na <sup>+</sup>	Sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaHS	Sulfhidrato de sodio
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico (por sus siglas en inglés)
nNOS	Óxido Nítrico Sintasa neuronal (por sus siglas en inglés)
NO	Óxido Nítrico
NSO	Neuronas sensoriales olfatorias
O <sub>2</sub>	Oxígeno
PKA	Proteína Cinasa A (por sus siglas en inglés)
PKG	Proteína Cinasa G (por sus siglas en inglés)
RTK	Receptor a tirosina cinasa
S <sup>2-</sup>	Ion sulfato
SNC	Sistema Nervioso Central

## Índice de Figuras

FIGURA 1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	32
FIGURA 2. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS PARA EL REGISTRO DE LA ACTIVIDAD DE CAMPO	34
FIGURA 3. ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO DE RATÓN	38
FIGURA 4. CURSO TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA POBLACIONAL DE REBANADAS DEL BULBO OLFATORIO.	39
FIGURA 5. ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO ANTE LA LIDOCAÍNA	40
FIGURA 6. EL NAHS AUMENTÓ LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO.	42
FIGURA 7. CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL NAHS SOBRE LA POTENCIA DE LA ACTIVIDAD DE CAMPO DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO DE RATÓN	43
FIGURA 8. RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD DE CAMPO DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO DEL RATÓN A LA HIPOXIA/REOXIGENACIÓN	45
FIGURA 9. CUANTIFICACIÓN DE LA RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD DE CAMPO DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO DE RATÓN A LA HIPOXIA/REOXIGENACIÓN	46
FIGURA 10. CURSO TEMPORAL DE LA RESPUESTA DEL BULBO OLFATORIO DE RATÓN A LA HIPOXIA	47
FIGURA 11. ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO EN PRESENCIA DE NAHS DURANTE LA FASE ESTABLE DE LA HIPOXIA Y LA REOXIGENACIÓN (PROTOCOLO 1).	49

FIGURA 12. ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO EN PRESENCIA DE NAHS DURANTE LA FASE ESTABLE DE LA HIPOXIA Y LA REOXIGENACIÓN (PROTOCOLO 1). 50

FIGURA 13. ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO ANTES Y DURANTE LA APLICACIÓN SIMULTÁNEA DE NAHS E HIPOXIA, ASÍ COMO LA REOXIGENACIÓN (PROTOCOLO 2). 52

FIGURA 14 ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO ANTES Y DURANTE LA APLICACIÓN SIMULTÁNEA DE NAHS E HIPOXIA, ASÍ COMO LA REOXIGENACIÓN (PROTOCOLO 2). 53

## Índice de Tablas

TABLA 1. POTENCIA DE LA ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO Y SU SENSIBILIDAD A LA LIDOCAÍNA. ....	37
TABLA 2. CAMBIOS EN LA POTENCIA ABSOLUTA DE LA ACTIVIDAD POBLACIONAL DEL BULBO OLFATORIO OCASIONADO POR EL NAHS A DOSIS CRECIENTES. ....	41
TABLA 3. CAMBIOS EN LA POTENCIA ABSOLUTA DE LA ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA DEL BULBO OLFATORIO OCASIONADO POR LA HIPOXIA-REOXIGENACIÓN. ....	46
TABLA 4. ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO EN PRESENCIA DE NAHS DURANTE LA FASE ESTABLE DE LA HIPOXIA Y LA REOXIGENACIÓN (PROTOCOLO 1). ....	49
TABLA 5. ACTIVIDAD POBLACIONAL DE LA CAPA GRANULAR DEL BULBO OLFATORIO ANTES Y DURANTE LA APLICACIÓN SIMULTÁNEA DE NAHS E HIPOXIA, ASÍ COMO LA REOXIGENACIÓN (PROTOCOLO 2). ....	52

## Resumen

El bulbo olfatorio sintetiza y libera sulfuro de hidrogeno, pero se desconoce si este gasotransmisor modula su actividad eléctrica en condiciones normales y en condiciones de disminución en la concentración de oxígeno (hipoxia). Mientras que la hipoxia modula la función olfatoria, el sulfuro de hidrogeno regula la respuesta a la hipoxia en varios circuitos neuronales. Por lo tanto, en esta tesis se propuso evaluar el efecto de un donador de sulfuro de hidrogeno (el sulfhidrato de sodio) sobre la actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio de ratón tanto en condiciones de oxigenación normal (normoxia), como en hipoxia. Para resolver esta pregunta empleamos rebanadas de bulbo olfatorio de ratón de 7-10 días de edad y se registró su actividad poblacional con la técnica de potencial local de campo. La normoxia fue mantenida con carbógeno, mientras que la hipoxia se indujo por gaseo con nitrógeno. Se evaluó el efecto del sulfhidrato de sodio en ambas condiciones de oxigenación. Los registros del potencial local de campo se analizaron con los siguientes métodos: la transformada rápida de Fourier y el análisis de frecuencias fundamentales. Los resultados sugirieron que el sulfhidrato de sodio (0.3, 1, 3 y 10 mM): (1) aumentó, de manera transitoria y dependiente de la concentración, la actividad poblacional del bulbo olfatorio, y (2) produjo oscilaciones en diferentes bandas de frecuencia (theta, beta y gamma). Asimismo, se demostró que el sulfhidrato de sodio revierte la depresión de la actividad poblacional inducida por la hipoxia. Finalmente, se demostró que la actividad oscilatoria inducida por el sulfhidrato de sodio fue resistente a la hipoxia. Estos resultados muestran que el sulfuro de hidrogeno es un modulador del circuito del bulbo olfatorio, además de que su acción moduladora revierte la depresión de la actividad bulbar en condiciones de hipoxia.

## Abstract

The olfactory bulb synthesizes and releases hydrogen sulfide, but whether this gasotransmitter modulates its electrical activity under normal conditions and under conditions of decreased oxygen concentration (hypoxia) is unknown. While hypoxia modulates olfactory function, hydrogen sulfide regulates the response to hypoxia in a variety of neural circuits. Therefore, this thesis proposed to evaluate the effect of a hydrogen sulfide donor (sodium hydrosulfide) on the mice olfactory bulb granular layer population activity both under normal oxygenation conditions (normoxia) and in hypoxia. To solve this question we used 7-10 days old mouse olfactory bulb slices and recorded their population activity with the local field potential technique. Normoxia was maintained with carbogen, while hypoxia was induced by nitrogen. The effect of sodium sulfhydrate was evaluated in both oxygenation conditions. The local field potential recordings were analyzed with the following methods: fast Fourier transform and fundamental frequency analysis. The results demonstrated that sodium hydrosulfide (0.3, 1, 3 and 10 mM): (1) increased, temporally and in a concentration-dependent manner, the population activity of the olfactory bulb, and (2) produced oscillations in different frequency bands (theta, beta and gamma). Likewise, sodium hydrosulfide reverses the hypoxia-induced depression of olfactory bulb population activity. Finally, the oscillatory activity induced by sodium hydrosulfide was resistant to hypoxia. These results show that hydrogen sulfide is a modulator of the olfactory bulb network and that hydrogen sulfide neuromodulation reverses hypoxia-induced bulbar activity depression.

## Introducción

La hipoxia es una condición en la que la concentración de oxígeno disponible en el tejido es inferior al rango fisiológico (Connett et al., 1990). Existen receptores que detectan los niveles de O<sub>2</sub> disponibles en plasma (Ward, 2008). Estos quimiorreceptores tienen una conexión con los centros superiores que regulan, inicialmente, el control neural de la respiración y del sistema cardiovascular (Prabhakar, 2000). Además, la disminución en la presión parcial de oxígeno es capaz de alterar la percepción olfatoria (Drobyshevsky et al., 2006; Huppertz et al., 2018a). Por ejemplo, uno de los componentes de la enfermedad aguda de montaña, que es producida mayormente por la hipoxia, es una reducción en la capacidad olfatoria (Huppertz et al., 2018a). Drobyshevsky et al. (2006) demostró que la hipoxia afecta la conectividad entre el epitelio olfatorio y el bulbo olfatorio, así como la plasticidad de este sistema ante la estimulación olfatoria repetitiva. Lo que indica que existe una relación íntima y recíproca entre la hipoxia y la función olfatoria. Por su parte, se ha propuesto al sulfuro de hidrogeno como un gas con la capacidad de disminuir o atenuar los efectos producidos por la hipoxia (Olson, 2013), por lo que la presencia de una enzima capaz de producir H<sub>2</sub>S, en el bulbo olfatorio (Shibuya et al., 2009), abre la posibilidad de que el H<sub>2</sub>S module la actividad del bulbo olfatorio y su respuesta a la hipoxia.

## El sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) forma parte del grupo de gasotransmisores que incluyen al óxido nítrico (NO) y al monóxido de carbono (CO). Estas moléculas tienen las siguientes características (Untereiner et al., 2012):

- a. Son moléculas gaseosas pequeñas, permeables a la membrana celular.
- b. No requieren de un receptor para producir sus efectos intracelulares.
- c. Son producidos endógenamente, de manera enzimática y su producción es regulada por un estímulo fisiológico.
- d. Sus efectos biológicos pueden ser mimetizados por las mismas moléculas aplicadas de manera exógena.

- e. Tienen blancos moleculares específicos. Por ejemplo, el NO y el CO tienen como blanco a la guanilato ciclasa (GC).
- f. Finalmente, sus efectos intracelulares podrían ser (o no ser) mediados por segundos mensajeros.

Al igual que el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO), el H<sub>2</sub>S es un gasotransmisor (Abe et al., 1996; Szabó, 2007; Wang, 2012a). El H<sub>2</sub>S se produce en diversos tejidos a partir de los aminoácidos cisteína y homocisteína (Kimura, 2002), por la acción de 3 enzimas: 1) la cistationina gama liasa (CSE), 2) la cistationina *beta* sintetasa (CBS) y 3) la 3-mercaptopiruvato sulfuro-transferasa (MST) (Shibuya et al., 2009; Stipanuk et al., 1982).

La enzima CSE se encuentra mayormente expresada en el sistema cardiovascular, en el hígado y el riñón (Kimura, 2014), mientras que la enzima CBS encuentra su mayor expresión en el sistema nervioso central (SNC) (Kimura, 2014), el hipocampo y el cerebelo, donde se expresa en astrocitos y otras células gliales (Abe et al., 1996; Enokido et al., 2005). Sin embargo, este concepto ha ido cambiando ya que ambas enzimas pueden expresarse tanto en el SNC como en tejidos periféricos.

La primera función electrofisiológica reportada en las neuronas fue la facilitación de la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP), al aumentar la actividad del receptor NMDA en el hipocampo, un modelo sináptico de formación de la memoria (Abe et al., 1996; O'Dell et al., 1991). A partir de este trabajo, el sulfuro de hidrógeno pasó de ser una molécula tóxica a ser un regulador fisiológico, que interviene en la regulación de la actividad de las neuronas serotoninérgicas (Wang et al., 2015), la neuroprotección contra el estrés oxidativo (Kimura, 2011), la modulación de moléculas de señalización intracelular (Kimura, 2000; Lee et al., 2007), la modulación de canales iónicos (Dawe et al., 2008; Nagai et al., 2004), la liberación y funcionamiento de otros neuromoduladores (Han et al., 2005). Además, puede fungir como una molécula de señalización ante estímulos específicos como: convulsiones febriles (Han et al., 2005b), estímulos dolorosos (Kawabata et al., 2007) e isquemia cerebral (Qu et al., 2006). Asimismo, el H<sub>2</sub>S participa en la supervivencia celular y tiene efectos protectores sobre neuronas y glía al participar

en la modulación de diversos canales y proteínas (Tan et al., 2010). Como ya se mencionó, el sistema olfatorio es influenciado por la hipoxia (Bleymehl et al., 2016) y, al mismo tiempo, la respuesta a la hipoxia puede involucrar al H<sub>2</sub>S (Levitt et al., 2011), por lo que la presencia de la enzima productora de H<sub>2</sub>S abre la posibilidad de que el H<sub>2</sub>S module la actividad del bulbo olfatorio y su respuesta a la hipoxia.

## Historia del sulfuro de hidrógeno

El H<sub>2</sub>S fue inicialmente considerado un gas tóxico (Ramazzini, 1700), para ser ahora conceptualizado como un gasotransmisor (Abe et al., 1996). La historia del H<sub>2</sub>S como un agente tóxico data de 1700 cuando Bernardo Ramazzini describió las alteraciones que este “gas de cloaca” causaba en los trabajadores de las alcantarillas de París (Ramazzini, 1700). Bernardo Ramazzini pensó, de manera acertada, que cuando los trabajadores limpiaban el excremento del drenaje se producía un gas tóxico que causaba irritación, inflamación y dolor de ojos (Felton, 1997). La hipótesis de Ramazzini fue más aceptada al descubrir que las monedas de cobre que portaban los trabajadores se tornaban negras en la superficie (Ramazzini, 1700). Esto le permitió sugerir que el gas causante de las alteraciones en los ojos era un ácido volátil capaz de ennegrecer monedas de cobre (Ramazzini, 1700).

El descubrimiento del H<sub>2</sub>S es atribuido al químico alemán Carl Wilhelm quien, en el año de 1775, produjo H<sub>2</sub>S a través de la reacción de un ácido con polisulfuros metálicos o calentando azufre en gas hidrógeno (Szabo, 2018). Después, el primer experimento *in vivo* realizado con H<sub>2</sub>S fue realizado en 1803 por el anatomista francés Francois Chaussier, quien describió los efectos letales del H<sub>2</sub>S administrado de manera tópica en un caballo expuesto al aire libre (Szabo, 2018).

Por más de 150 años diversos investigadores intentaron demostrar los efectos tóxicos del H<sub>2</sub>S en varias especies, incluidos los seres humanos. Además, se crearon métodos para su detección, límites de exposición ocupacional y efectos genotóxicos, condenando al H<sub>2</sub>S como un agente tóxico (Knight et al., 2005)

Asimismo, el H<sub>2</sub>S fue catalogado como un producto de desecho bacteriano (Szabo, 2018). En 1877 Ulysse Gayon, un microbiólogo francés, reportó la existencia de bacterias capaces de producir H<sub>2</sub>S en huevos de gallina podridos. En los siguientes 100 años se demostró la existencia del H<sub>2</sub>S como producto de diversas bacterias. Además, se identificaron los sustratos y las vías metabólicas utilizadas para la síntesis de H<sub>2</sub>S (Szabo, 2018), mismas que se describieron previamente.

El H<sub>2</sub>S fue reconocido como mediador de procesos biológicos en 1930 por parte del bioquímico Vincent Du Vigneaud quien descubrió y nombró a la vía de la “transulfuración” implicada en la conversión de cistationina en cisteína y homocisteína, en varios tejidos de mamíferos. Du Vigneaud sintetizó L-cistationina, y demostró que este compuesto sostenía el crecimiento de ratas (du Vigneaud et al., 1934). Posteriormente, en 1967, el odontólogo Rizzo descubrió la producción de H<sub>2</sub>S por parte de la microbiota oral y, en los años siguientes fueron identificadas las bacterias productoras de H<sub>2</sub>S en la microbiota intestinal (Rizzo, 1967).

El H<sub>2</sub>S obtuvo una nueva reputación en 1968 al ser identificado como parte de los procesos de protección, supervivencia y señalización en plantas. En 1977, Jack Corliss, un biólogo marino, describió la importancia del H<sub>2</sub>S para la vida marina en profundidad, e.g. los gusanos tubulares utilizan al H<sub>2</sub>S como fuente primaria de energía (Jannasch et al., 1981). Posteriormente en 1990 se reportó la presencia de H<sub>2</sub>S en el cerebro de varios mamíferos, incluidos los humanos, y fue evidente su producción endógena y su participación en la fisiología de los mamíferos (Goodwin et al., 1989). Por su parte, los investigadores japoneses Abe y Kimura (1996), realizaron experimentos para dilucidar la influencia del H<sub>2</sub>S en el (SNC) sistema nervioso central. Su investigación arrojó 3 resultados importantes: 1) la expresión del mRNA de la enzima CBS en la corteza, hipocampo, tallo cerebral y cerebelo; 2) la producción de H<sub>2</sub>S en homogenados cerebrales, un déficit en la concentración de H<sub>2</sub>S afecta la función neuronal y 3) el H<sub>2</sub>S facilitó inducción de la potenciación a largo plazo (LTP por sus siglas en inglés) en el hipocampo al aumentar la actividad del receptor NMDA (Abe et al., 1996).

En las décadas consecuentes a los 90's, el H<sub>2</sub>S fue reconocido como un gasotransmisor con funciones fisiológicas en diversos órganos y tejidos. Además, las vías enzimáticas de síntesis del H<sub>2</sub>S y sus principales mecanismos de acción fueron reportados (Kimura, 2014). Así, se han publicado diversos artículos que demostraron los efectos biológicos en áreas como: las neurociencias (Abe et al., 1996; Ishigami et al., 2009), el sistema cardiovascular (Hosoki et al., 1997; Zhao, 2001) el sistema inmune e inflamación (Hu et al., 2007; Zanardo et al., 2006), la señalización celular (Sen et al., 2012) y el metabolismo (Hine et al., 2015).

## Propiedades químicas del H<sub>2</sub>S

El H<sub>2</sub>S es un gas biológicamente activo con un característico olor a huevo podrido, que tiene un punto de ebullición de 60 °C (Ungerer et al., 2004) y posee una naturaleza ácida (pK<sub>a1</sub> = 6.98) (Powell, 2018). El H<sub>2</sub>S no forma enlaces de hidrógeno y es lipofílico, lo que le permite pasar a través de membranas biológicas y actuar como una molécula de señalización paracrina (Powell et al., 2018). En solución acuosa, 37 °C y pH de 7.4, aproximadamente un 20% de H<sub>2</sub>S existe en su forma no disociada, mientras que el resto se encuentra disociada en HS<sup>-</sup> y solo trazas de S<sup>2-</sup> se pueden encontrar, de acuerdo a la siguiente reacción (Kimura, 2012):



Además, el H<sub>2</sub>S es detectable en plasma y en diversos tejidos a concentraciones aproximadas de 50 μM (Furne et al., 2008). Cabe destacar que en el cerebro la concentración de H<sub>2</sub>S es de alrededor de 150 μM (Tan et al., 2010). Es importante aclarar que la concentración plasmática de H<sub>2</sub>S en diversos tejidos es variable, dependiendo del método empleado. En la sangre se han detectado concentraciones nanomolares con HPLC (Levitt et al., 2011), mientras que por el método de Ag<sub>2</sub>S se han detectado hasta 9.2 μM (Ishigami et al., 2009).

Para el estudio de los efectos del H<sub>2</sub>S existen diferentes tipos de donadores: orgánicos o inorgánicos (Kimura, 2012). El sulfhidrato de sodio (NaHS) es un donador inorgánico que tiene la capacidad de disociarse en Na<sup>+</sup> y HS<sup>-</sup> (Levitt et al., 2011). En solución, el sulfhidrato puede unirse al H<sup>+</sup> y formar H<sub>2</sub>S (Tan et al., 2010).

Esta reacción es inmediata y produce un pico de concentración muy rápida de H<sub>2</sub>S, el cual declina rápidamente debido a sus propiedades físicas ya que se escapa rápidamente (Szabo et al., 2017). Debido a esto, soluciones stock deben ser preparadas recientemente y deben usarse de manera inmediata. La vida media del H<sub>2</sub>S generado de las sales inorgánicas se encuentran en el rango de 5-30 min, dependiendo de la calidad del agua y de las condiciones experimentales, incluyendo el tipo de célula, el número de células, la forma del tejido, la temperatura, y otros factores (Szabo et al., 2017).

## Efectos del H<sub>2</sub>S en SNC.

### Efectos del H<sub>2</sub>S en proteínas de señalización intracelular

En: (1) cultivos primarios de neuronas de la corteza y el cerebelo y (2) líneas celulares de neuronas y células gliales (Kimura, 2000). Se sugiere que el incremento del AMPc/PKA y la consecuente activación de PKA incrementa la conectividad sináptica durante LTP (Kimura, 2000). El proceso de LTP es completamente bloqueado en la región CA1 de hipocampo al usar inhibidores de PKA (Blitzer et al., 1995). Por otra parte, la activación farmacológica de PKA favorece la fase tardía de la LTP (Roberson et al., 1996). Por lo tanto, se sugiere que el H<sub>2</sub>S puede aumentar la sensibilidad de los receptores de glutamato tipo NMDA de manera indirecta al modificar las concentraciones de AMPc e inducir una cascada de señalización que induce la LTP (Kimura, 2000). Por otra parte, en células de microglía la activación de la vía AMPc/PKA puede estimular a los receptores de rianodina que conducen a la liberación de (Ca<sup>2+</sup>) calcio mediada por Ca<sup>2+</sup> y la modulación de diversos canales de Ca<sup>2+</sup> (Berridge, 1998). Por lo tanto, se propone que el H<sub>2</sub>S está implicado indirectamente en la modulación del flujo de Ca<sup>2+</sup> a través de la activación de la vía AMPc/PKA (Berridge, 1998).

El H<sub>2</sub>S también puede modular al receptor de tirosina cinasa (RTK). En este sentido, este receptor se encuentra localizado en la superficie de la membrana celular y participa en procesos como: diferenciación, proliferación y supervivencia celular

(Schlessinger, 2000). El H<sub>2</sub>S puede mejorar la actividad reductora al disminuir especies reactivas de oxígeno (ERO) y ayudar a proteger a las neuronas del estrés oxidativo a través de la activación del receptor RTK (Schlessinger, 2000).

El H<sub>2</sub>S modula la actividad de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las MAPK son una gran familia de cinasas que se dividen en cinco grupos distintos: ERKs 1 y 2; c-Jun cinasas amino-terminales (JNKs 1 y 2); ERKs 3 y 4; ERK5 y, finalmente, las isoformas de p38 (α, β, γ, δ) (Roux y Blenis, 2004). Las MAPK se activan por fosforilación y participan en procesos como la apoptosis, la diferenciación, el metabolismo, la motilidad y la división celular (Roux y Blenis, 2004). Se ha propuesto que el H<sub>2</sub>S puede inhibir la producción de óxido nítrico inducida por lipopolisacáridos en células de microglía al suprimir la actividad de p38-MAPK (Hu, 2007). Estos datos sugieren que el H<sub>2</sub>S puede participar en la terapéutica de enfermedades que cursen con neuroinflamación o isquemia cerebral (Tan et al., 2010).

#### Efectos del H<sub>2</sub>S en canales iónicos

El H<sub>2</sub>S puede modular diversos canales iónicos, entre ellos, varios canales de Ca<sup>2+</sup>, canales de (K<sup>+</sup>) potasio y canales de (Cl<sup>-</sup>) cloro. Por ejemplo, el H<sub>2</sub>S incrementa los niveles de Ca<sup>2+</sup> en neuronas, astrocitos y células gliales a través de la modulación de canales iónicos (Lee et al., 2006; Nagai et al., 2004).

El H<sub>2</sub>S produce respuestas bifásicas en neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal que se caracterizan por una despolarización inicial seguida de una hiperpolarización sostenida (Kombian et al., 1993). Este efecto despolarizante es sensible a bloqueadores de canales de Ca<sup>2+</sup> como el cadmio. Sin embargo, esta despolarización inducida por el H<sub>2</sub>S no es sensible a bloqueadores de canales de Na<sup>+</sup> como la tetrodotoxina. Es posible que la mayor parte del efecto despolarizante producido por el H<sub>2</sub>S esté mediado por canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje, como es el caso, de los canales tipo-L y tipo-T (Huguenard, 1996).

Los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo-L son codificados por 4 genes (Cav1.1–Cav1.4), que se expresan en neuronas y células endocrinas (Lipscombe et al., 2004). Estos canales

regulan diversas funciones como la liberación de neurohormonas, neurotransmisores, expresión de genes, supervivencia celular y modulan la actividad de otros canales iónicos como los receptores NMDA (Lipscombe et al., 2004). El H<sub>2</sub>S actúa directamente sobre los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo-L de los subtipos Ca<sub>v</sub>1.2 y Ca<sub>v</sub>1.3 (Lipscombe et al., 2004). Esto promueve la liberación de neurotransmisores y expresión de genes. Por otra parte, los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo-T están implicados en la generación de ráfagas de disparos neuronales, en la generación de oscilaciones neuronales intrínsecas, en la potenciación de señales sinápticas y en la despolarización para alcanzar el umbral de disparo (Lipscombe et al., 2004). En estudios realizados con la técnica de *patch clamp*, el sulfhidrato de sodio (NaHS), un donador de H<sub>2</sub>S, promovió corrientes de Ca<sup>2+</sup> a través de la activación de canales tipo-T, sugiriendo que el H<sub>2</sub>S actúa sobre este tipo de canales (Kawabata et al., 2007).

El H<sub>2</sub>S también puede activar diversos canales de K<sup>+</sup> como los canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>) y los canales de K<sup>+</sup> sensibles a Ca<sup>2+</sup> (K<sub>Ca2+</sub>) (Dawe et al., 2008). Esto se ha observado en neuronas del hipotálamo y neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal. La modulación del H<sub>2</sub>S sobre los canales K<sub>ATP</sub> sugiere una participación del H<sub>2</sub>S en procesos de neuroprotección (Kombian et al., 1993). Esto se demostró usando bloqueadores de canales K<sub>ATP</sub>, como la glibenclamida, que evitan la neuroprotección inducida por H<sub>2</sub>S en cultivos celulares sometidos a estrés (Kimura et al., 2004). Lo que sugiere que el efecto neuroprotector del H<sub>2</sub>S requiere de los canales K<sub>ATP</sub> (Kimura et al., 2004).

Además, el H<sub>2</sub>S puede activar canales de Cl<sup>-</sup> del tipo CFTR (Kimura et al., 2006). Por ejemplo, el H<sub>2</sub>S activa canales CFTR en la línea celular de tipo neuronal HT22 y protege a estas células contra la toxicidad mediada por glutamato. Esto se demostró al usar bloqueadores específicos de los canales CFTR que previenen la toxicidad inducida por glutamato (Kimura et al., 2006).

## Regulación del H<sub>2</sub>S sobre sistemas neurotransmisores

El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es uno de los neurotransmisores con mayor presencia en el SNC. Además, el GABA es el neurotransmisor inhibitor por excelencia. Se estima que del 20 al 30% de todas las sinapsis que ocurren en el SNC utilizan GABA (Kaila, 1994). El H<sub>2</sub>S interactúa con el sistema (Han et al., 2005). Por ejemplo, el H<sub>2</sub>S revierte la pérdida de los receptores a GABA tipo GABABR1 y GABABR2 producida por las convulsiones febriles recurrentes (Han et al., 2005). El glutamato es un aminoácido excitador que funciona como neuromodulador en el cerebro de los mamíferos y que regula múltiples funciones del SNC como el aprendizaje, la memoria y la inducción de LTP (Hudspith, 1997), entre muchas otras (Kimura, 2011). Como se mencionó anteriormente, el H<sub>2</sub>S puede modular, de manera indirecta, a los receptores NMDA a través de la vía AMPc/PKA (Kimura, 2000).

Se sabe que el bulbo olfatorio expresa conexiones bidireccionales, tanto glutamatérgicas como GABAérgicas, entre las células mitrales/empenachadas con las células granulares (Shepherd, 1972), lo que le permite generar una amplia variedad de patrones de actividad poblacional (Rojas-Líbano et al., 2008a). Debido a que este circuito expresa componentes que permiten la síntesis de H<sub>2</sub>S, así como los blancos de modulación de este gasotransmisor, uno de los objetivos de esta tesis es investigar la modulación de este circuito por el H<sub>2</sub>S. Por ello, en una sección posterior, se describirá brevemente la anatomía y función de esta estructura.

## El H<sub>2</sub>S como sensor de oxígeno

Los organismos vivos requieren oxígeno para sobrevivir y para funcionar de manera óptima (Ward, 2008). Por ello, se han desarrollado mecanismos fisiológicos muy precisos para detectar los niveles de este gas en el medio ambiente y el medio interno (Ward, 2008). Existen tejidos especializados en detectar la falta de oxígeno y emitir una respuesta, tales como: el cuerpo carotideo, los cuerpos neuroepiteliales y las células cromafines del feto (Ward, 2008).

Las células glómicas (también llamadas: células tipo 1), localizadas en el cuerpo carotideo, producen una adaptación fisiológica que aumenta la frecuencia respiratoria en respuesta a una disminución del oxígeno sistémico (Kim et al., 2020). Las células glómicas, que se consideran el principal sensor de O<sub>2</sub>, expresan a la enzima CSE, por lo que tienen la capacidad de producir H<sub>2</sub>S (Peng et al., 2010). Cuando las células glómicas detectan concentraciones bajas de oxígeno se produce una señalización dependiente de Ca<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>S (Peng et al., 2010). Al comparar la respuesta de las células glómicas ante hipoxia y el NaHS (donador de H<sub>2</sub>S) se demostró que ambas condiciones producían respuestas similares (Peng et al., 2010). Por el contrario, cuando se utilizó un medio libre de Ca<sup>2+</sup> y las células glómicas fueron sometidas a hipoxia, su respuesta fue abolida (Peng et al., 2010). Asimismo, al utilizar un bloqueador de la CSE (enzima productora de H<sub>2</sub>S) la respuesta de las células glómicas ante la hipoxia disminuye (Peng et al., 2010). Se sabe que los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L de las células glómicas son activados por el estado *redox* que produce la hipoxia y son inactivados en condiciones de normoxia (Summers et al., 2000). Por su parte, el H<sub>2</sub>S modifica covalentemente los residuos de cisteína sensibles a *redox* en las proteínas a través del mecanismo de persulfuración (o S-sulfhidración) (Mustafa et al., 2009), lo que modifica las corrientes de Ca<sup>2+</sup> (Li et al., 2010). Estos datos sugieren una participación crucial del H<sub>2</sub>S en la respuesta de las células glómicas ante la hipoxia. Así, el H<sub>2</sub>S liberado induce la activación del reflejo quimiorreceptor que causa un aumento en la frecuencia cardíaca, la frecuencia respiratoria y la presión sanguínea que, en conjunto, ayudan a mantener la homeostasis cardiorrespiratoria (Yuan et al., 2016). Es probable que este papel regulador del H<sub>2</sub>S en las respuestas a la hipoxia, se extienda más allá de los circuitos neuronales involucrados en la regulación de las funciones vitales, y se exprese en otros circuitos involucrados en otras funciones (e.g. la percepción sensorial). De hecho, una de las especializaciones del sistema olfatorio es la percepción de la hipoxia (Arieli, 1990; Bleyemehl et al., 2016), misma que regula la percepción olfatoria (Bigdaj et al., 2018; Drobyshevsky et al., 2006; Huppertz et al., 2018b). Además, como se verá más adelante, el sistema olfatorio expresa componentes que le permiten la síntesis de H<sub>2</sub>S (Shibuya et al., 2009).

Otro tejido clave en las respuestas a la hipoxia son las arterias pulmonares. Estas arterias se constriñen en respuesta a la hipoxia en un fenómeno denominado vasoconstricción pulmonaria hipóxica (HPV, por sus siglas en inglés) que contribuye a optimizar la ventilación (Prieto-Lloret et al., 2015). En las arterias pulmonares de todos los mamíferos se ha observado que esta respuesta adaptativa desvía el flujo sanguíneo pulmonar de las partes del pulmón con una ventilación inadecuada hacia áreas mejor ventiladas (Prieto-Lloret et al., 2015). Esta respuesta es importante para la relación de la perfusión sanguínea con la ventilación al mejorar la eficiencia del intercambio pulmonar de gases y, en consecuencia, mantener la oxigenación arterial. Al igual que las células glómicas, las arterias pulmonares y el resto del sistema cardiovascular expresa a la enzima CSE (Wang, 2012b). Se sabe que la aplicación de cisteína a las arterias pulmonares de la rata potencia su HPV (Prieto-Lloret et al., 2015). Este efecto fue bloqueado al utilizar DL-Propargilglicina, un inhibidor de la enzima CSE, lo que sugiere, que la potenciación de la respuesta contráctil inducida por cisteína es debida a la producción de sulfuro de hidrógeno (Prieto-Lloret et al., 2015).

Las células cromafines del feto y los neonatos liberan catecolaminas en respuesta a la hipoxia (Slotkin et al., 1988). Aunque los cuerpos carotídeos actúan como sensores principales ante la hipoxia en adultos, en neonatos son menos sensibles a la hipoxia (Pawar et al., 2008). Sin embargo, las células cromafines resultan sumamente sensibles a los cambios de la oxigenación y liberan catecolaminas en respuesta a la hipoxia (Souvannakitti et al., 2009), lo cual resulta crítico para mantener la homeostasis en neonatos bajo estrés hipóxico (Souvannakitti & Prabhakar, 2009). Al igual que las células glómicas, las células cromafines contienen a la enzima CSE y tienen la capacidad de producir H<sub>2</sub>S (Peng et al., 2010). Al realizar experimentos con ratones carentes (*knockout*) de la enzima CSE o con inhibidores específicos de la enzima CSE (DL-Propargilglicina) se observó que la liberación de catecolaminas de las células cromafines en respuesta a la hipoxia fue mucho menor al compararse con ratones silvestres (*wild type*) o en presencia del vehículo, respectivamente (Peng et al., 2010). Los cuerpos neuroepiteliales son agrupaciones celulares localizadas en el lumen del tracto ventilatorio y puntos de

ramificación que también son sensibles a la hipoxia (Ward, 2008). Estas células están inervadas por el nervio vago y liberan neuromoduladores ante el déficit de oxígeno (Kemp et al., 2002). Existen diversas publicaciones que señalan al H<sub>2</sub>S como una molécula clave en la percepción de la hipoxia (Olson, 2013; Peng et al., 2010; Wu et al., 2015). Entre ellas, se ha observado que: 1) los tejidos con la capacidad de sensar oxígeno pueden producir H<sub>2</sub>S, 2) la presencia de un estado hipóxico aumenta la síntesis de H<sub>2</sub>S, 3) el aumento en la síntesis de H<sub>2</sub>S ante la hipoxia se revierte al normalizar la oxigenación (Bleymehl et al., 2016). Todo lo anterior parece suceder en el sistema olfatorio.

Recientemente se ha demostrado que los ratones pueden percibir y discriminar ambientes con déficit de oxígeno (Bleymehl et al., 2016). De hecho, también se ha demostrado que existen neuronas en el epitelio olfatorio de los ratones que expresan a la guanilato ciclasa soluble 1b2 (GC1b2) y al canal de potencial transitorio tipo c2 (Trpc2, por sus siglas en inglés) y que son sensibles a la hipoxia a través de un mecanismo dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Bleymehl et al., 2016). Es probable que esta sensibilidad a la hipoxia en el sistema sensorial olfatorio permite que una baja concentración de oxígeno resulte aversiva a los animales (Bleymehl et al., 2016), por lo que este comportamiento permitiría a un ratón evaluar entornos con diferentes niveles de oxígeno y permanecer en un ambiente seguro. La detección de niveles bajos de oxígeno por las neuronas sensoriales olfatorias puede contribuir a identificar y recordar ubicaciones apropiadas para la construcción de madrigueras y nidos (Bleymehl et al., 2016). Además de la sensibilidad del sistema olfatorio a la hipoxia (Arieli, 1990; Bleymehl et al., 2016), la baja en la concentración de oxígeno es capaz de alterar la percepción olfatoria (Drobyshevsky et al., 2006; Huppertz et al., 2018a). Por ejemplo, uno de los componentes de la enfermedad aguda de montaña, que es producida mayormente por la hipoxia, es una reducción en la capacidad olfatoria (Huppertz et al., 2018a). Para reproducir esta condición se ha sometido a sujetos a hipoxia sostenida y observado que la hipoxia reduce la sensibilidad olfatoria (Altundağ et al., 2014; Huppertz et al., 2018b; Kuehn et al., 2008). Drobyshevsky et al. (2006) demostró que la hipoxia afecta la conectividad entre el epitelio olfatorio y el bulbo olfatorio, así como la plasticidad de este sistema

ante la estimulación olfatoria repetitiva. Lo que indica que existe una relación íntima y recíproca entre la hipoxia y la función olfatoria.

## Sistema olfatorio

El sistema olfatorio está encargado de detectar moléculas que se constituyen en estímulos olfatorios provenientes del medio ambiente. Estos compuestos pueden ser de carácter volátil, con una masa molecular de entre 20 a 300 Da o compuestos solubles no volátiles (Firestein, 2001; Mori et al., 2006). Los mamíferos han desarrollado 2 sistemas para detectar estímulos olfatorios: 1) el sistema olfatorio principal, encargado de la localización de alimentos, presas/depredadores e identificación de territorios (Purves D., 2001; Su et al., 2009) y 2) el sistema olfatorio accesorio que participa en la identificación de parejas sexuales (Song et al., 2008).

La transducción olfatoria inicia cuando los receptores olfatorios, localizados en el epitelio olfatorio, detectan moléculas odorantes (Firestein, 2001; Mori et al., 2006). Los mamíferos poseen un aproximado de 1000 receptores especializados en detectar estímulos olfativos. Estos receptores poseen 7 segmentos transmembranales acoplados a proteínas G y son denominados neuronas sensoriales olfatorias (NSO), (Firestein, 2001; Mori et al., 2006). Las NSO se activan de manera preferencial al tipo de odorante que las estimule y el número de receptores que se activa es proporcional a la cantidad de moléculas que las estimule (Kandel, 2013).

En el epitelio olfatorio existen 3 tipos celulares: 1) las NSO, 2) las células de soporte y 3) las células basales. Las células basales se encargan de remplazar a las NSO aproximadamente cada 45 días. Estas células son remplazadas de manera constante para mantener una población uniforme. Por su parte, las células de soporte, como su nombre lo indica, se encargan de mantener la homeostasis en el medio. (Kandel, 2013). Las glándulas de Bowman, localizadas también en el epitelio olfatorio, le confieren humedad al secretar moco (Kandel, 2013). Las glándulas de Bowman también generan enzimas que ayudan a metabolizar agentes externos que se han absorbido en la mucosa (Hawkes., 2009).

## Bulbo olfatorio

El bulbo olfatorio es el primer centro de relevo de información olfatoria en el SNC, porque recibe a los nervios olfatorios provenientes de las NSO del epitelio olfatorio (Nagayama S, 2014). El bulbo olfatorio posee una organización laminar en la que se distinguen 6 capas, que se disponen radialmente (Shepherd, 1972) y se describen a continuación:

- La primera capa del bulbo olfatorio está conformada por los nervios olfatorios (axones de las neuronas sensoriales olfatorias), además de células gliales (Allison, 1953).
- La segunda capa del bulbo olfatorio (capa glomerular) se compone de los botones de los nervios olfatorios, de las dendritas de las células mitrales y las células empenachadas (*tufted cells*), así como de interneuronas periglomerulares y glía. Los axones de los receptores olfatorios y las dendritas de las células mitrales, así como las interneuronas locales, forman estructuras esféricas de aproximadamente 80-160  $\mu\text{m}$  de diámetro denominados glomérulos olfatorios (Shipley, 1996). En esta capa, los nervios olfatorios hacen sinapsis glutamatérgicas con las dendritas de las células mitrales y empenachadas, que también son glutamatérgicas (Ressler et al., 1993).
- La tercera capa del bulbo olfatorio (plexiforme externa), está compuesta por las dendritas secundarias de las células mitrales y las de las células granulares, que establecen sinapsis dendrodendríticas bidireccionales entre ellas (Scott JW, 1986). En estas sinapsis dendrodendríticas bidireccionales, la sinapsis desde la célula mitral hacia la célula granular esta mediada por glutamato y excita a la neurona granular (Shepherd, 1972). Por el contrario, la sinapsis que va de la célula granular hacia la célula mitral es mediada por GABA y, por lo tanto, inhibe a la neurona mitral (Shepherd, 1972).
- La cuarta capa del bulbo olfatorio, denominada capa mitral, consta de los somas de las células mitrales, los cuales suelen ser grandes (25-35  $\mu\text{m}$ )

(Mouradian et al., 1988). Las células mitrales envían proyecciones hacia el bulbo olfatorio contralateral, a través del núcleo olfatorio anterior. Además, las células mitrales envían proyecciones al tubérculo olfatorio, así como a la corteza piriforme, la amígdala y la corteza entorrinal, entre otras cortezas (Shipley et al., 1996).

- La quinta capa del bulbo olfatorio recibe el nombre de capa plexiforme interna, la cual carece de cuerpos celulares, pero abunda en neuropilos (Shepherd, 1972).
- La capa más profunda del bulbo olfatorio (capa granular) contiene los somas de las células granulares, que tienen un diámetro de 8-10  $\mu\text{m}$ . En ocasiones, las células granulares se agrupan en agregados y forman uniones intercelulares de tipo *gap* que sirven para sincronizar su actividad (Reyher et al., 1991). Además, como ya se mencionó, las células granulares envían dendritas hacia la capa plexiforme externa, donde se ramifican de manera extensa e interactúan con las dendritas de las células mitrales y las empenachadas, a través de sinapsis dendrodendríticas (Shipley et al., 1996).

En cuanto a las aferencias que recibe el bulbo olfatorio, además de las que provienen del epitelio olfatorio, existen vías centrífugas que envían proyecciones al bulbo olfatorio desde otros circuitos del sistema nervioso (Schoenfeld et al., 1984). La principal vía centrífuga la constituyen axones de retroalimentación provenientes de la corteza (principalmente la corteza olfatoria) (Clark, 1957). Además, existe una vía noradrenérgica procedente del locus coeruleus (McLean et al., 1987), una vía serotoninérgica proveniente del rafe dorsal (McLean et al., 1989) y, por último, una vía colinérgica que desciende del prosencéfalo (Carson K.A, 1984). La acción de estas vías neuromoduladoras está ligada a la plasticidad sináptica, así como a la memoria y al aprendizaje olfatorio (Shepherd, 1972).

## Oscilaciones neuronales y actividad poblacional del bulbo olfatorio

El cerebro es una red neuronal compleja e interconectada que presenta actividad eléctrica sincronizada (Bressler et al., 2001). La comunicación y sincronización neuronal depende de 2 factores principales: 1) la estructura formada por los componentes anatómicos que conectan a cada una de las neuronas entre ellas y 2) la transmisión de la información de una neurona a otras (Schnitzler et al., 2005). Estos dos factores determinan el rendimiento de toda red neuronal (Schnitzler et al., 2005). Las oscilaciones neuronales poblacionales son una característica de la mayoría de las redes neuronales que se basan en la actividad neuronal y en la sincronización de la misma (Schnitzler et al., 2005). Además, la coherencia en las oscilaciones refleja la precisión que tienen estas interacciones temporales en la actividad neuronal (Schnitzler et al., 2005).

Las oscilaciones son la base del poder de cómputo que poseen los sistemas neuronales para procesar la información que es transmitida mediante potenciales de acción y potenciada por patrones de disparo neuronales; a su vez, los patrones de disparo cambian en relación de la fase del ritmo subyacente (Llinás, 2002). Lo que sugiere la existencia de frecuencias fundamentales que promueven o inhiben la transmisión de una señal (Skaggs et al., 1996). Las oscilaciones neuronales son variaciones rítmicas, sincronizadas y periódicas en el registro de la actividad neuronal de campo (Schnitzler et al., 2005). Esta actividad se relaciona con cambios en el potencial de membrana unicelular, con el disparo organizado de potenciales de acción y con actividad sináptica coherente (Schnitzler et al., 2005). La actividad local de campo (LFP, por sus siglas en inglés) representa a las fluctuaciones de voltaje extracelular producto de los procesos mencionados (Whittington et al., 2000). Por ello, cuando las poblaciones neuronales se activan al unísono, ya sea por su conexión recíproca o por una entrada coherente, se produce actividad oscilatoria que facilita la sincronización (Bressler et al., 2001).

Los LFP son originados por la coincidencia espacio-temporal de los potenciales post-sinápticos excitadores (por sus siglas en inglés, EPSP) o por los potenciales post-sinápticos inhibidores (por sus siglas en inglés, IPSP), así como por los

potenciales de acción (Bressler et al., 2001). Además, las oscilaciones en los LFP representan regularidades en la entrada a las neuronas locales (Bressler et al., 2001). Las oscilaciones pueden modificar el comportamiento del disparo neuronal y pueden ser originadas por varias poblaciones neuronales, cada una, disparando de manera organizada en los ciclos que comprenden una oscilación (Schnitzler & Gross, 2005, Malik & Ferguson, 2016). La actividad sincrónica de las redes neuronales corticales puede ser detectada y cuantificada a través de estudios como la magnetoencefalografía (MEG) y la electroencefalografía (EEG). Estos análisis de conectividad permiten estudiar los vínculos interestructurales que hacen posible el funcionamiento del cerebro (Sakkalis, 2011). Algunas de estas conexiones suceden de manera lineal y en ocasiones pueden surgir de manera simultánea (Bowyer, 2016).

La generación y la frecuencia de las oscilaciones dependen de mecanismos de marcapasos celular y de las propiedades de la red neuronal (Malik et al., 2016). En general, las oscilaciones de mayor frecuencia se originan en poblaciones neuronales pequeñas, mientras que las oscilaciones de baja frecuencia abarcan poblaciones más grandes (Whittington et al., 2000; Kay, 2009).

Cuando la actividad poblacional de campo es medida en el sistema olfatorio, se pueden distinguir componentes oscilatorios en distintas bandas de frecuencia. En mamíferos, se distinguen las siguientes oscilaciones: *theta* (1–12 Hz), *beta* (15–30 Hz) y *gamma* (40–100 Hz) (Kay et al., 2009). Los patrones oscilatorios del bulbo olfatorio son considerados la base operacional que le permite la representación y el procesamiento de la información olfatoria (Kay et al., 2010). El bulbo olfatorio establece comunicación con otras áreas del encéfalo involucradas en procesamientos ulteriores de la información olfatoria (Kay et al., 2010). Esta interacción se logra, en gran medida, a través de la coordinación de las oscilaciones generadas coherentemente entre estos circuitos (Rojas-Líbano et al., 2012).

En el bulbo olfatorio la oscilación *theta* (1-12 Hz) se genera, en gran medida, por la entrada de información rítmica, acoplada al ritmo respiratorio, que es producida por la mecanotransducción, producida por las neuronas sensoriales olfatorias, durante

los ciclos de inhalación/exhalación (Kay et al., 2010). Estas oscilaciones también pueden ser generadas durante tareas de memoria y discriminación olfativa, a través de una interacción entre el bulbo olfatorio y el hipocampo (Kay et al., 2010). También, se ha observado que la respiración de ratas y ratones cambia de frecuencia dependiendo del estado conductual. Por ejemplo, durante la anestesia el ritmo respiratorio es de 0.5-1.5 Hz, en reposo es de 2-4 Hz, en tareas exploratorias es de 5-6 Hz y durante inhalación activa (*sniffing*) la frecuencia es de 7-12 Hz (Mainland et al., 2006; Rojas-Líbano et al., 2012).

Las oscilaciones de tipo *beta* del bulbo olfatorio se relacionan a tareas de aprendizaje y asociación de olores. Estas tareas correlacionan con la actividad de la corteza piriforme y la corteza entorrinal (Fontanini et al., 2006), que imponen el ritmo beta al bulbo olfatorio a través de las fibras centrífugas (Fontanini et al., 2006). Por su parte, las oscilaciones *gamma* dependen de los circuitos locales y aumentan en amplitud si el bulbo olfatorio está aislado de la entrada centrífuga (Gray et al., 1988). Como ya se mencionó, las oscilaciones beta (15-30 Hz) dependen de la entrada centrífuga y desaparecen cuando esta entrada se abate temporal o permanentemente (Martin et al., 2006). Además, las oscilaciones *beta* son altamente coherentes con la actividad simultánea registrada en diversas áreas del sistema olfativo, mientras que las oscilaciones *gamma* no son muy coherentes en todas las áreas (Kay, 2014). El poder de la oscilación *beta* aumenta con olores volátiles y al existir aprendizaje de discriminación de olores. Además, estas oscilaciones pueden coordinar los disparos de las células mitrales (MC) que reclutan neuronas en la corteza piriforme (PC), que pueden coordinarse en ensamblajes neuronales para facilitar la comunicación entre regiones (de Almeida et al., 2013; Mori et al., 2013).

En el bulbo olfatorio, la oscilación *gamma* es evocada por la presentación del olor y surge en la transición de la inhalación a la exhalación (Kay et al., 2010). Esta oscilación es generada por la sinapsis recíproca dendrodendrítica entre las células mitrales/empenachadas con las células granulares (Rojas-Líbano et al., 2008b). De hecho, existen 2 tipos de oscilaciones *gamma* registradas en bulbo olfatorio y la

corteza piriforme (Rojas-Líbano et al., 2008b). La primera banda de frecuencia en *gamma* (60-100 Hz) se denomina “*gamma* 1” o “*gamma* rápido” y es evocada por el olor que se transmite en la transición de la inhalación a la exhalación (Rojas-Líbano et al., 2008b). La segunda banda de frecuencia en *gamma* (40-60 Hz) se denomina “*gamma* 2” o “*gamma* lento” son oscilaciones de baja frecuencia descritas en ratas y ratones (Rojas-Líbano et al., 2008b). Estas oscilaciones ocurren en periodos de baja frecuencia respiratoria y muestran una alta coherencia con oscilaciones en la corteza piriforme (Rojas-Líbano et al., 2008b). Además, se sabe que estas oscilaciones están influenciadas por la excitabilidad de las células granulares (Kay, 2014).

Las sinapsis dendrodendríticas mantienen una comunicación bidireccional entre las células granulares con las células mitrales/empenachadas (Rojas-Líbano et al., 2008a). Como ya se mencionó, algunos autores sugieren que esta sinapsis participa en la generación y sincronización de los patrones oscilatorios del bulbo olfatorio (Arevian et al., 2008; Friedman et al., 2000). Por lo tanto, se ha descrito que la alteración de los mecanismos sinápticos dendrodendríticos ocasiona alteraciones en la generación de las oscilaciones y, por ende, en la representación, procesamiento y evocación de la información olfativa (Friedman et al., 2000). Por esto, se considera que las oscilaciones poblacionales son fundamentales para el correcto funcionamiento del bulbo olfatorio (Martin et al., 2012) y su modulación se relaciona con cambios en el procesamiento olfatorio (Martin et al., 2012). Con base en todo lo anterior, es de relevancia determinar si el H<sub>2</sub>S modula la actividad del bulbo olfatorio y su respuesta a la hipoxia. Esta propuesta es altamente factible debido a que ya existe evidencia de que el H<sub>2</sub>S modula la actividad poblacional en otro circuito neuronal. En concreto, se ha demostrado que la exposición a H<sub>2</sub>S aumenta la actividad *theta* tanto en CA1 como en el giro dentado (Skrajny et al., 1996), lo que pudiera también ocurrir en el bulbo olfatorio.

## Justificación

Se sabe que el bulbo olfatorio produce  $H_2S$ , pero se desconoce si este gasotransmisor modula la actividad poblacional de esta estructura. Además, hay evidencia de que el bulbo olfatorio es sensible a la hipoxia, mientras que el  $H_2S$  es un elemento clave en las respuestas a la hipoxia. Por lo tanto, esta tesis también estudió si el  $H_2S$  regula la actividad del bulbo olfatorio en diferentes condiciones de oxigenación.

## Hipótesis

La administración de un donador de  $H_2S$  (NaHS) en rebanadas del bulbo olfatorio de ratón aumentará su actividad poblacional. Además, la administración de NaHS atenuará la depresión de la actividad poblacional del bulbo olfatorio en condiciones de hipoxia.

## Objetivos

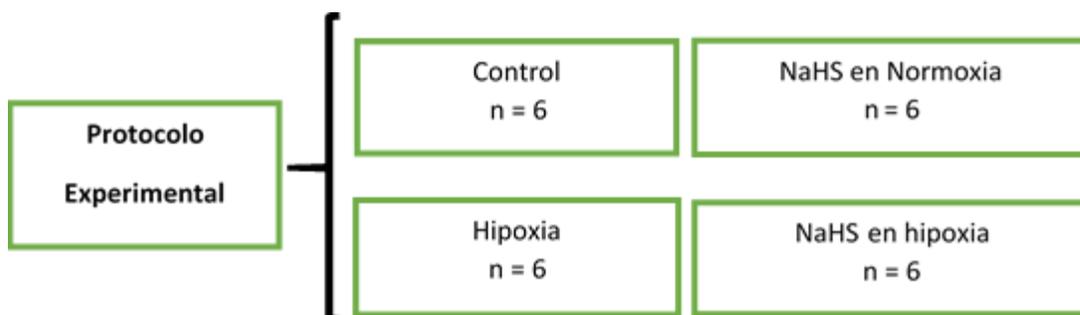
### General

Revelar los efectos del  $H_2S$  sobre la actividad poblacional del bulo olfatorio de ratón en condiciones de normoxia y de hipoxia.

### Específicos

1. Determinar si la administración de NaHS en rebanadas de bulbo olfatorio modula la actividad de campo en condiciones de normoxia.
2. Determinar si la administración de NaHS en rebanadas de bulbo olfatorio modula la actividad de campo en condiciones de hipoxia.

## Protocolo experimental



**Figura 1.** Protocolo experimental que muestra a manera de esquema los grupos experimentales que fueron utilizados.

## Métodos

Los procedimientos realizados en los animales y protocolos de la presente investigación fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, Universidad Autónoma de México y están basados en la Norma Oficial Mexicana para el Uso y el Bienestar de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

### Animales

Se utilizaron 42 ratones macho de la cepa C57BL/6 de 7 a 14 días de edad. Todos los sujetos se mantuvieron con libre acceso a agua y alimento, en una habitación donde la temperatura se mantuvo constante ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y hubo un ciclo circadiano controlado de 12h luz / 12h oscuridad.

Los animales se dividieron en 4 grupos. El primer grupo fue control no tratado ( $n=6$ ). Al segundo grupo de 6 animales, considerado experimental-sulfuro/normoxia, se le administró  $\text{H}_2\text{S}$  a varias concentraciones (0.3, 1, 3 y 10 mM;  $n=6$ ). Al tercer grupo se le aplicó hipoxia ( $n=6$ ) y el cuarto grupo, considerado experimental-sulfuro/hipoxia, fue sometido a hipoxia con la administración de  $\text{H}_2\text{S}$  ( $n=6$ ) (Figura 1).

## Obtención de las rebanadas de bulbo olfatorio

Para la obtención de las rebanadas de bulbo olfatorio, se anestesió al ratón con pentobarbital sódico (70 mg/kg i.p). Posteriormente, se revisaron los reflejos del ratón (palpebral y presión a la cola) para comprobar el plano de anestesia. Una vez que el animal estuvo profundamente anestesiado, se procedió a realizar una perfusión intracardiaca con solución protectora (en mM: 238 sacarosa, 30 glucosa, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl y 2.5 MgCl<sub>2</sub>), burbujeada con carbógeno (95%O<sub>2</sub> - 5%CO<sub>2</sub>), con la finalidad de preservar el tejido encefálico (Peña et al., 2010).

A continuación, el encéfalo del ratón fue colocado en una caja petri con líquido ceforraquídeo artificial (LCRa; en mM: 119 NaCl, 30 glucosa, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub> y 1.5 CaCl<sub>2</sub>.) burbujeado con carbógeno. Después, el encéfalo fue seccionado con un corte sagital entre ambos hemisferios y un segundo corte coronal, por detrás del lóbulo frontal, para separar los bulbos olfatorios del resto del encéfalo. Ulteriormente, los bulbos olfatorios fueron colocados sobre un bloque de agar al 4%.

Utilizando un vibratomo, se cortaron rebanadas de 400 µm en dirección caudo-rostral. Posteriormente, se dejó reposar a las rebanadas en cámaras de recuperación con LCRa, con burbujeo constante de carbógeno, a temperatura ambiente durante al menos 1 hora.

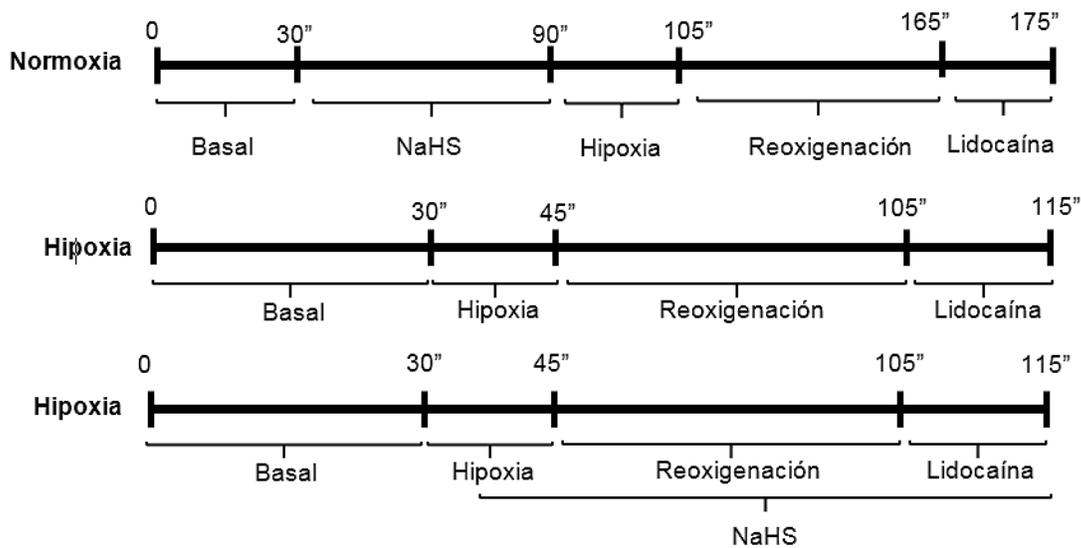
## Registros electrofisiológicos

### Actividad espontánea poblacional

Un electrodo de borosilicato con una resistencia de 0.5 – 1 MΩ fue llenado de LCRa y se colocó sobre la capa granular del bulbo olfatorio para registrar, durante 30 minutos, la actividad poblacional espontánea.

Posteriormente, se añadió el H<sub>2</sub>S (0.3, 1, 3 y 10 mM) al baño de registro y se registró durante 30 min. Por último, se añadió lidocaína y se registró por 10 minutos para comprobar la viabilidad de la rebanada (Peña et al., 2010).

Para determinar los efectos del H<sub>2</sub>S en las condiciones de hipoxia y normoxia se utilizaron rebanadas independientes. Después del registro basal, el tejido fue sometido a condiciones de hipoxia, que se indujo por un gaseo con nitrógeno (95%N<sub>2</sub> - 5%CO<sub>2</sub>), durante 15 minutos. Después del periodo de hipoxia, se reestablecieron las condiciones de re-oxigenación por gaseo con carbógeno. En un grupo independiente de rebanadas, se añadió H<sub>2</sub>S (3 mM) antes y durante la hipoxia. Al término del experimento se colocó lidocaína (1 mM) para comprobar la viabilidad de la rebanada (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema representativo de los grupos experimentales utilizados para el registro de la actividad de campo. Se muestran los distintos grupos de experimentación en las dos condiciones de oxigenación.

# Análisis

## Estadística

Los registros obtenidos de las rebanadas fueron analizados con el programa Clampfit (Molecular Devices, versión 9.2). Se obtuvieron espectros de potencia de ventanas de 10 s utilizando la transformada de Fourier (Peña et al., 2005). Se graficaron los espectros de potencia de 1 a 120 Hz (ventanas de 10 s). Para la comparación estadística entre las diferentes condiciones se analizó la sumatoria de las potencias de las frecuencias de 1 – 120 Hz de cada registro (Potencia integrada). Después, se utilizaron los programas Sigma Plot y Prisma para elaborar gráficas y pruebas estadísticas. Se utilizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis, seguida de la comparación múltiple de Student-Newman-Keuls, para analizar las posibles diferencias entre los grupos control, normoxia + H<sub>2</sub>S. Además, mediante la misma prueba, se analizaron el grupo de hipoxia, hipoxia en presencia de H<sub>2</sub>S. Por último, se analizaron las diferencias entre el grupo control y el grupo de vehículo mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

## Frecuencias fundamentales

Las técnicas estándar utilizadas para identificar frecuencias fundamentales implican el uso de una transformada rápida de Fourier (por sus siglas en inglés, FFT) a la serie temporal y luego se examina el espectro de potencia o el espectrograma. Sin embargo, el espectro de potencia supone que los datos son invariables en el tiempo, una suposición que no es válida para los datos neuronales. Por otra parte, el espectrograma no asume invariabilidad ya que mide la potencia en cada frecuencia en función del tiempo, pero examinar un espectrograma para una sesión de datos larga resulta difícil porque cada ventana de tiempo contribuye con una columna al espectrograma. Además, como los datos neuronales tienen una baja relación señal-ruido, identificar las frecuencias fundamentales dentro de cada ventana de tiempo puede ser difícil (Masimore et al., 2004). Debido a esta problemática Masimore *et al.*, (2004) propone la correlación de los valores de potencia de cada frecuencia a través de las muestras de tiempo dentro del espectrograma, es decir, esta técnica

combina dos métodos de análisis las transformadas de Fourier y las matrices de correlación (Masimore et al., 2004). Para ello, las fluctuaciones del voltaje dependientes del tiempo  $V(t)$  se dividen en ventanas de tiempo individuales, continuas, contiguas y no superpuestas. La extensión de la ventana de tiempo se determina con la frecuencia más baja en la transformada de Fourier de  $V(t)$ , mientras que la tasa de adquisición de datos limita a la frecuencia superior. El voltaje se somete a una transformada rápida de Fourier y luego se multiplica por su complejo conjugado para obtener la densidad espectral en función de la frecuencia. Después, se cuantifica el coeficiente de correlación convencional ( $\rho_{ij}$ ), donde los índices  $i$  y  $j$  denotan diferentes frecuencias dentro de la misma serie de tiempo. La correlación entre el espectro de potencia  $S(f)$  se expresa como:  $f_i$  para una frecuencia y  $f_j$  para la otra frecuencia:

$$\rho_{ij} = \frac{\sum_k (S_k(f_i) - \langle S(f_i) \rangle)(S_k(f_j) - \langle S(f_j) \rangle)}{\sigma_i \sigma_j}$$

Donde en la ventana de tiempo  $k$ ,  $S_k(f_i)$  es la densidad espectral de la frecuencia  $f_i$ ,  $\langle S(f_i) \rangle$  representa el promedio de la densidad espectral de la frecuencia  $f_i$  en todas las ventanas de tiempo,  $\sigma_i$  simboliza la desviación estándar de la densidad espectral a la frecuencia  $f_i$ . Debido a que la densidad espectral en cualquier frecuencia siempre estará perfectamente correlacionada consigo misma,  $\rho_{ii}$  siempre será la unidad. Por lo tanto, un coeficiente de correlación con un valor de cero se mostrara en blanco, mientras que una alta correlación se mostrara en un color oscuro. En las gráficas, la diagonal representa  $\rho_{ii}$  y, por lo tanto, tiene un valor de 1, ya que,  $\rho_{ij} = \rho_{ji}$ . Consecuentemente, las frecuencias fundamentales generadas biológicamente aparecen como áreas de alta correlación y reflejan cuadrados simétricos cerca de la diagonal. Las regiones oscuras fuera del eje indican interacciones entre osciladores. El ruido no biológico aparece como líneas agudas que no correlaciona en estas gráficas. Por lo tanto, se emplea el coeficiente

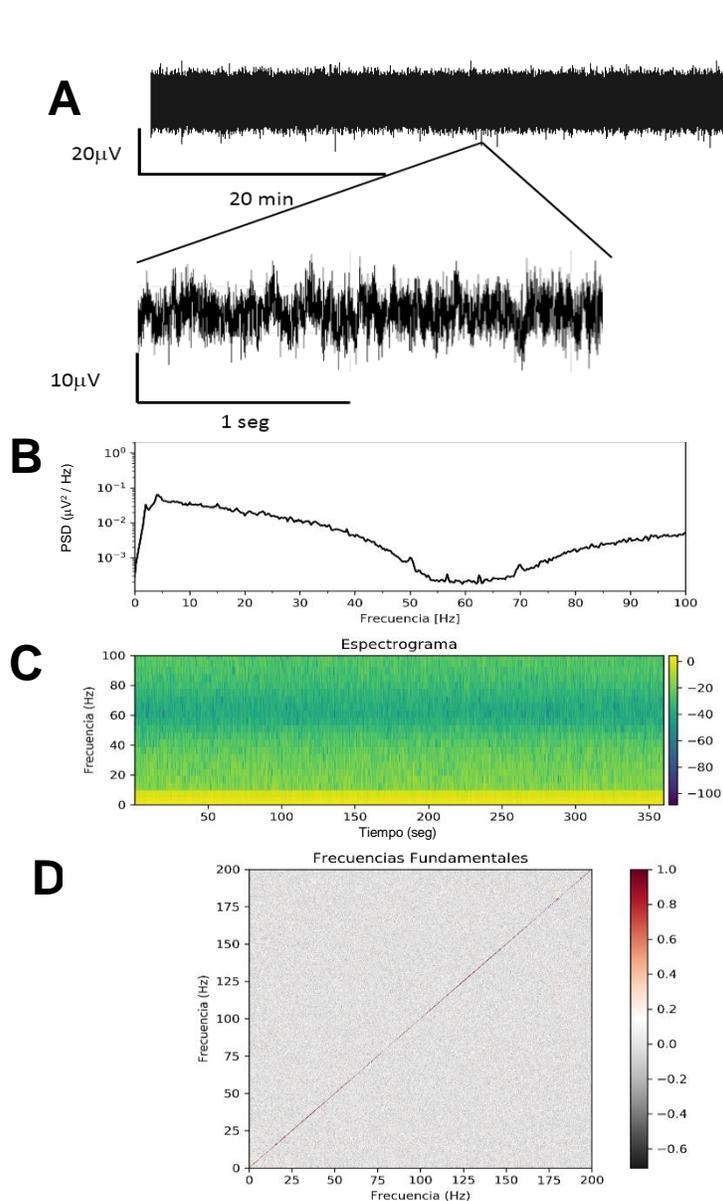
de correlación para analizar los datos de LFP de un solo electrodo que toma mediciones de un solo sitio, de esta manera, este análisis implica la auto-coherencia de la señal de LFP.

## Resultados

El registro de campo de rebanadas de bulbo olfatorio de ratón muestra una actividad poblacional de bajo voltaje, arrítmica y con una mezcla aleatoria de diferentes componentes de frecuencia (Figura 3-A,D). Lo anterior, se puede observar en un espectro de potencia o en un espectrograma que, para la actividad de la capa granular del bulbo olfatorio de ratón, no muestra una frecuencia fundamental o dominante en promedio o durante el registro, respectivamente (Figura 3-B,C). De la misma manera, el análisis de frecuencias fundamentales no muestra correlación alguna entre las frecuencias que componen la señal poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio de ratón (Figura 3-D). La aplicación de lidocaína al final del registro muestra que la actividad poblacional registrada en la capa granular del bulbo olfatorio de ratón es de origen neuronal.

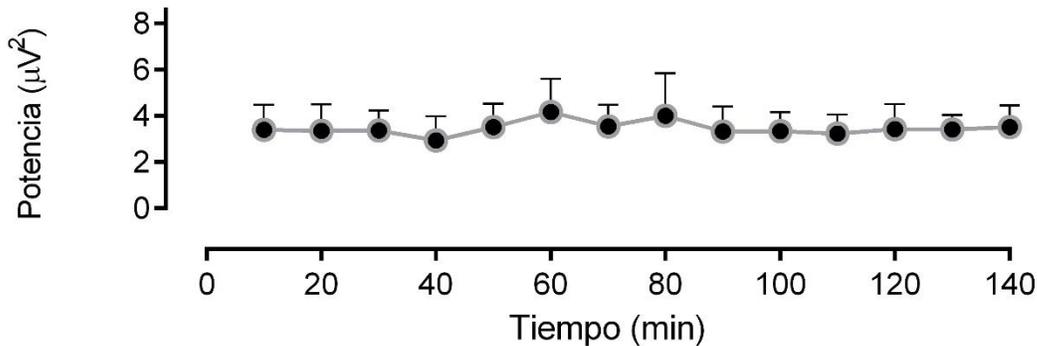
	<b>Potencia total (<math>\mu\text{V}^2</math>)</b>	<b>Theta (<math>\mu\text{V}^2</math>)</b>	<b>Beta (<math>\mu\text{V}^2</math>)</b>	<b>Gamma lento (<math>\mu\text{V}^2</math>)</b>	<b>Gamma Rápido (<math>\mu\text{V}^2</math>)</b>
<b>Control</b>	4.614 $\pm$ 1.747	1.640 $\pm$ 1.014	0.594 $\pm$ 0.059	0.751 $\pm$ 0.563	1.709 $\pm$ 0.973
<b>Lidocaína</b>	<b>1.658<math>\pm</math>0.850</b>	<b>1.091<math>\pm</math>0.883</b>	<b>0.164<math>\pm</math>0.049</b>	<b>0.173<math>\pm</math>0.129</b>	<b>0.246<math>\pm</math>0.078</b>

**Tabla 1. Potencia de la actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio y su sensibilidad a la lidocaína.** Se muestra la potencia de la actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio en la banda ancha (1–120 Hz) y en las diferentes bandas de frecuencia (*theta*: 1-12Hz, *beta*: 12-30 Hz, *gamma* lento: 30-60Hz y *gamma* rápido: 60-120 Hz). Antes (Control) y después de la aplicación de lidocaína (1 mM). Los resultados en negritas son aquellos que muestran una diferencia significativa con respecto a su control ( $P < 0.05$ , prueba *Wilcoxon*;  $n=6$ ).



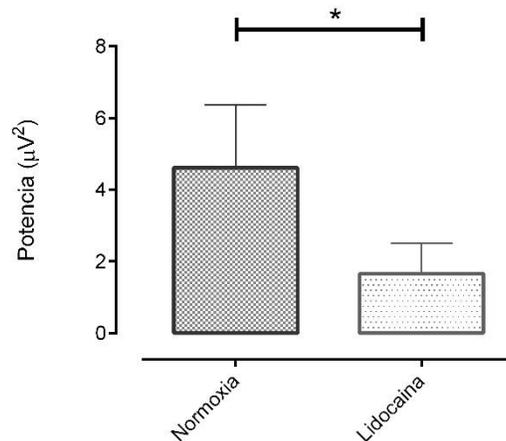
**Figura 3.** Actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio de ratón. **A.** Se muestra el trazo comprimido de la actividad poblacional del bulbo olfatorio (trazo superior) durante 80 minutos y su depresión en respuesta a la aplicación de lidocaína (flecha roja). Se muestran también dos trazos expandidos de segmentos (identificados en el vértice de las líneas) en condiciones control y en presencia de lidocaína (trazos inferiores). **B.** Se muestra el espectro de densidad de potencia (PSD, por sus siglas en inglés) de la actividad control. **C.** Espectrograma de 6 minutos de la actividad control de la capa granular del bulbo olfatorio. **D.** Matriz de correlación de las frecuencias de la actividad control del bulbo olfatorio.

Para evaluar si las rebanadas de bulbo olfatorio presentan actividad espontánea poblacional estable por periodos prolongados de tiempo, se realizó un registro control (en ausencia de cualquier manipulación) por el total de minutos que duran los experimentos farmacológicos (140 min; n=10) (Figura 4).



**Figura 4. Curso temporal de la actividad espontánea poblacional de rebanadas del bulbo olfatorio.** Se grafica la potencia de la actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio en la banda ancha (1–120 Hz) evaluada cada 10 minutos (n=6). Se observa que la actividad poblacional de la capa granular se mantiene estable durante 140 minutos.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la actividad del bulbo olfatorio se mantiene estable y no decae durante 2 horas. De hecho, en condiciones basales, al principio del experimento, la potencia de la actividad espontánea del bulbo olfatorio fue de  $3.859 \pm 0.627 \mu V^2$  (n=6) y después de 120 minutos la actividad permaneció estable y sin cambio significativo ( $4.185 \pm 1.320 \mu V^2$ ; n=6;  $p > 0.05$  vs basal; U de Mann-Whitney) (Tabla 1). Esto nos permitió continuar con las siguientes fases del protocolo experimental dado que los posibles cambios a observar por los tratamientos farmacológicos podrán ser adjudicados a los mismos y no a un cambio en la actividad del bulbo olfatorio por el tiempo de registro. Además, a manera de control, siempre se evaluó el origen neuronal de la actividad registrada al evaluar el efecto de la lidocaína (bloqueador de canales de  $Na^+$ ; Peña, 2010). Para estos experimentos control, la aplicación de lidocaína redujo la actividad espontánea del bulbo olfatorio de  $4.614 \pm 1.747 \mu V^2$  (n=6) en condiciones basales a  $1.658 \pm 0.850 \mu V^2$  ( $p < 0.05$  lidocaína vs basal; U de Mann-Whitney) (Figura 5).



**Figura 5. Actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio ante la lidocaína.** Se grafica la potencia de la actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio en la banda ancha (1–120 Hz) después de un periodo de estabilización y después de la aplicación de lidocaína 1 mM (n=6). Note que la actividad poblacional de las rebanadas de bulbo olfatorio es reducida significativamente por la aplicación de lidocaína, lo que permite concluir que esta actividad es de origen neuronal. \* denota una diferencia significativa entre las condiciones experimentales señalada con la línea ( $p < 0.05$ ; U de Mann-Whitney; n=6).

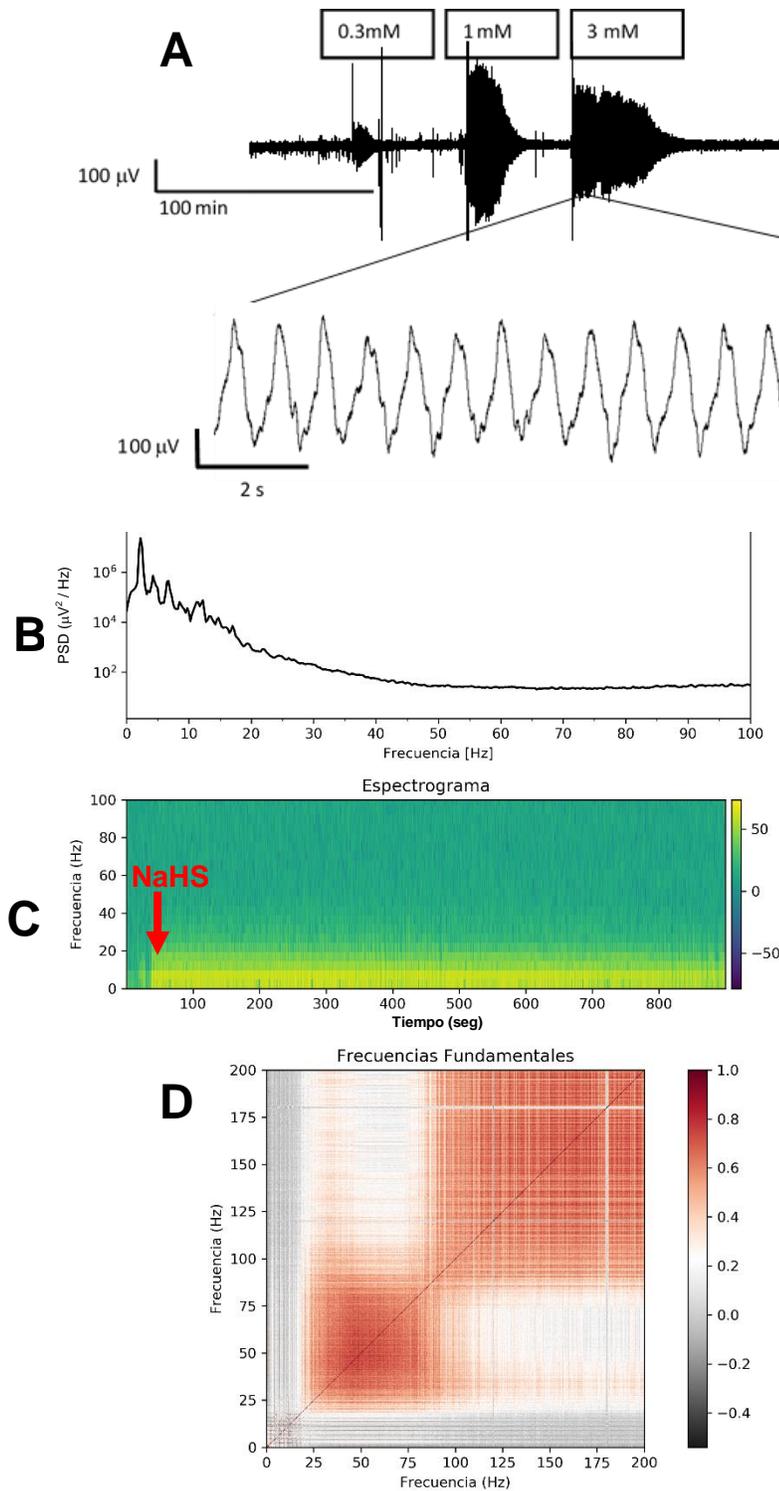
Debido a que el  $H_2S$  es un gasotransmisor, resulta complicado administrarlo en la forma de gas. Sin embargo, existen donadores de  $H_2S$ , como el sulfhidrato de sodio (NaHS), que permiten la administración de  $H_2S$  en preparaciones *in vitro* (Levitt, 2011). Por ello, para evaluar la modulación de la actividad del bulbo olfatorio por el  $H_2S$ , el NaHS se administró a diferentes concentraciones (0.3, 1, 3 y 10 mM). Estas concentraciones están basadas en un antecedente directo (Malik et al., 2015).

Los resultados muestran que la aplicación de NaHS aumentó de manera transitoria, y dependiente de la concentración, la actividad poblacional del bulbo olfatorio e induce oscilaciones (Figuras 6 y 7). Además, la amplitud y la duración de este incremento son mayores cuando se aplican concentraciones crecientes del NaHS (Figuras 6 y 7). En todos los casos, después del incremento en la amplitud de la actividad poblacional producido por el NaHS, la actividad regresó a niveles similares a la actividad basal (Figura 6-A).

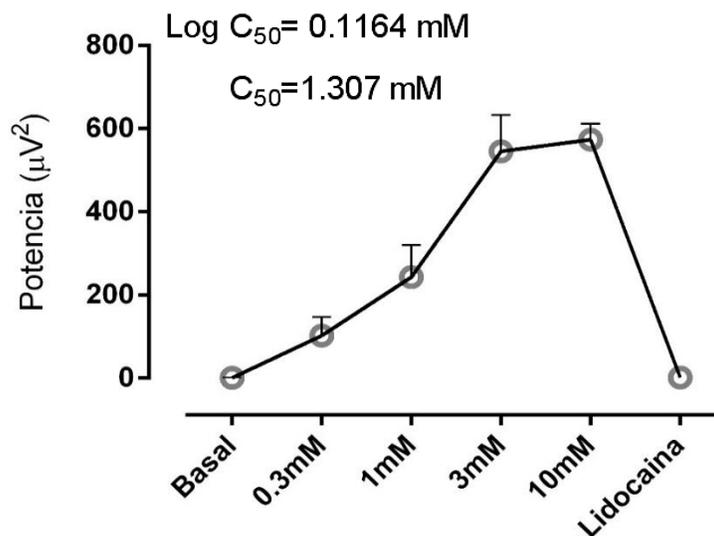
El análisis espectral muestra que el aumento del poder de la actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio producido por el NaHS ocurrió en las frecuencias de 1 a 20 Hz (Figura 6-B). Por último, el análisis de frecuencias fundamentales muestra que en presencia de NaHS existió alta correlación temporal en las bandas de frecuencia *theta*, *beta* y *gamma* (Figura 6-D).

	Banda ancha ( $\mu V^2$ )	Theta ( $\mu V^2$ )	Beta ( $\mu V^2$ )	Gamma lento ( $\mu V^2$ )	Gamma rápido ( $\mu V^2$ )
<b>Basal NaHS</b>	1.792±0.406	1.153±0.348	0.474±0.040	0.056±0.006	0.135±0.060
<b>0.3 mM</b>	<b>88.523±69.662***</b>	<b>82.203±69.890***</b>	<b>5.962±2.618***</b>	<b>0.680±0.330***</b>	<b>0.556±0.413*</b>
<b>1 mM</b>	<b>208.979±122.114***</b>	<b>204.629±121.340***</b>	<b>4.699±1.816***</b>	<b>0.458±0.188***</b>	<b>0.459±0.209*</b>
<b>3 mM</b>	<b>475.297±151.099***</b>	<b>468.720±149.911***</b>	<b>8.900±3.450***</b>	<b>0.358±0.178***</b>	<b>0.471±0.192*</b>
<b>10 mM</b>	<b>586.212±58.051***</b>	<b>560.386±57.515***</b>	<b>10.239±2.908***</b>	<b>0.383±0.108***</b>	<b>0.646±0.217*</b>
<b>Lidocaína</b>	1.430±0.158	0.898±0.121	<b>0.315±0.035*</b>	0.096±0.005	0.054±0.002

**Tabla 2. Cambios en la potencia de la actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio ocasionado por el NaHS a dosis crecientes.** Se muestran las potencias para la banda ancha (1–120 Hz) y las bandas de frecuencia *theta*: 1-12Hz, *beta*: 12-30 Hz, *gamma* lento: 30-60Hz y *gamma* rápido: 60-120 Hz, en condiciones control y en presencia de NaHS en concentraciones crecientes. Los resultados en negritas indican diferencia significativa con respecto al control (\*\*\*)= $P < 0.001$ , prueba *Kruskal-Wallis*, *post hoc* comparación múltiple de *Student-Newman-Keuls* n=6)



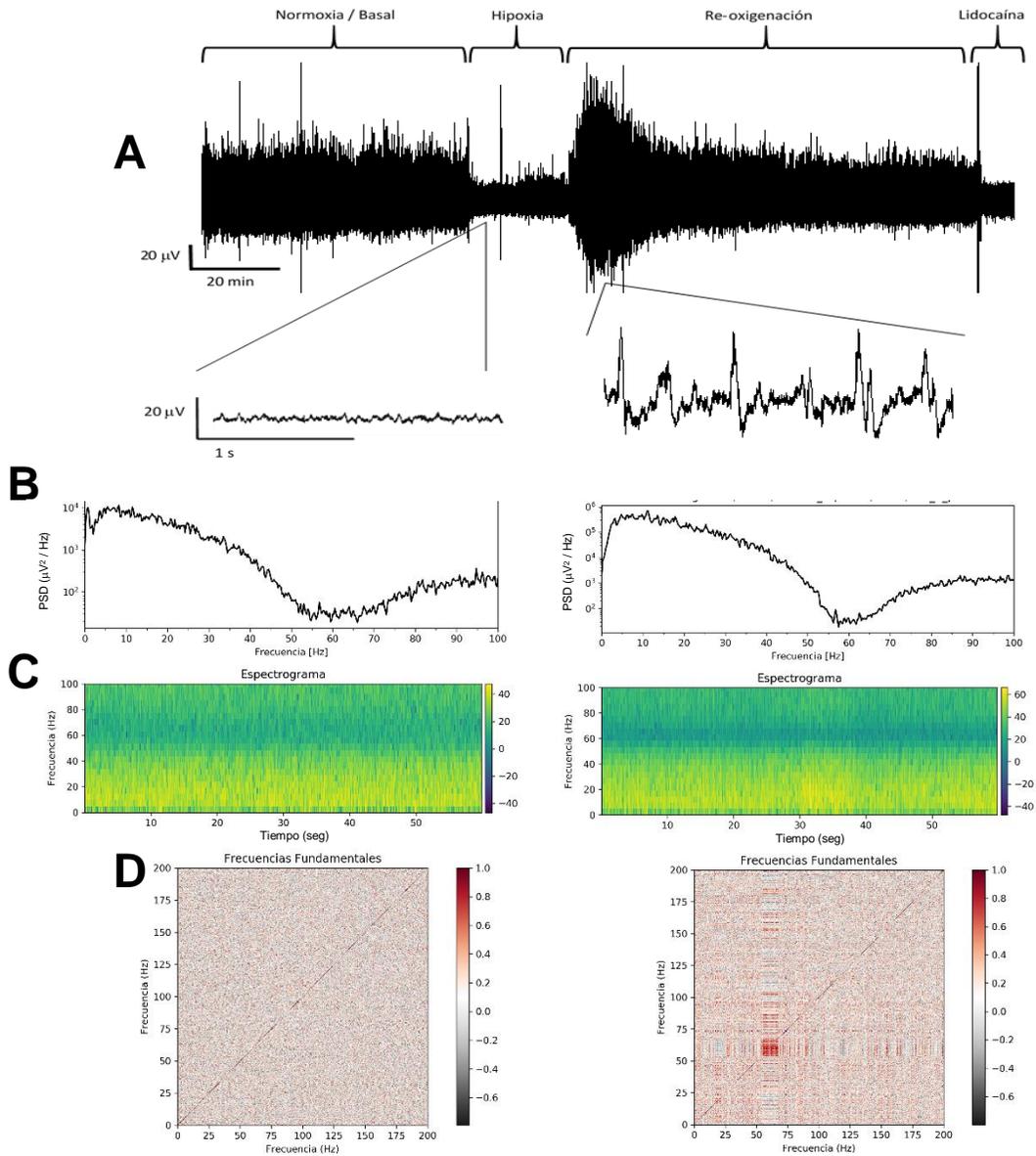
**Figura 6. El NaHS aumentó la actividad espontánea de la capa granular del bulbo olfatorio. A.** Se muestra el trazo representativo comprimido de la actividad poblacional del bulbo olfatorio (trazo superior) durante 350 minutos, en condiciones basales y durante la aplicación de concentraciones crecientes de NaHS (0.3, 1, 3 y 10 mM). En el panel inferior se muestra el trazo expandido (identificado en el vértice de las líneas) donde se pueden apreciar las oscilaciones evocadas por el NaHS (3 mM). **B.** Espectro de potencia correspondiente a la actividad en presencia de NaHS (3 mM). **C.** Espectrograma de la actividad de la capa granular del bulbo olfatorio en presencia de NaHS (3 mM, que inicia su aplicación en la flecha roja). **D.** Matriz de correlación de las frecuencias de la actividad del bulbo olfatorio en presencia de NaHS (3 mM).



**Figura 7. Cuantificación del efecto de la administración del NaHS sobre la potencia de la actividad de campo de la capa granular del bulbo olfatorio de ratón.** Se cuantificó la potencia absoluta de la actividad del bulbo en la banda ancha (1–120 Hz) en relación a la concentración de NaHS. Se observó un incremento dependiente de la concentración. Para fines de comparación se muestran la potencia de la actividad basal (previa a la aplicación del fármaco) y la potencia de la actividad tras la aplicación de lidocaína 1 mM.

La cuantificación de la potencia de la actividad del bulbo olfatorio muestra que con respecto a la actividad basal ( $1.792 \pm 0.406 \mu V^2$ ), la aplicación de NaHS a concentraciones distintas (0.3, 1, 3 y 10 mM) incrementó la potencia de la actividad del bulbo olfatorio a  $88.523 \pm 69.662 \mu V^2$ ,  $208.979 \pm 122.114 \mu V^2$ ,  $475.297 \pm 151.099 \mu V^2$  y  $586.212 \pm 58.051 \mu V^2$ , respectivamente (Figura 7; Tabla 2). Con respecto a la actividad basal, las concentraciones 1, 3 y 10 mM aumentaron la actividad de manera significativa ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis). Sin embargo, al comparar las respuestas de las diferentes dosis no se encontró alguna diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de 1, 3 y 10 mM ( $p > 0.05$ ; Kruskal-Wallis). Por ello, se decidió usar la concentración de 3 mM, como una concentración intermedia, para los experimentos correspondientes a la aplicación de hipoxia.

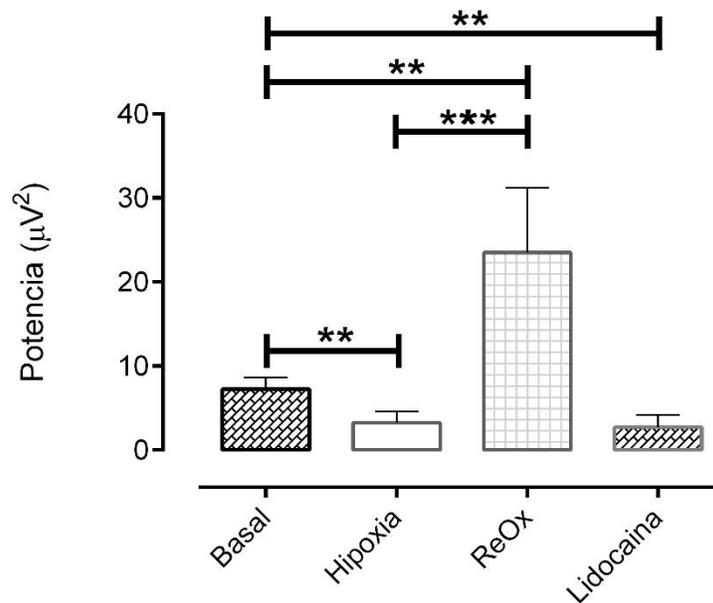
Con la finalidad de evaluar el efecto del NaHS sobre la respuesta del bulbo olfatorio a la hipoxia/reoxigenación, primero se procedió a caracterizar la respuesta a la hipoxia/reoxigenación en rebanadas control (en ausencia de fármaco; Figura 8). En estos experimentos, la hipoxia redujo la amplitud de la actividad poblacional del bulbo olfatorio de  $7.247 \pm 1.391 \mu V^2$  en condiciones basales a  $3.253 \pm 1.370 \mu V^2$  después de 4 minutos de iniciadas las condiciones de hipoxia (Tabla 3; Figura 9). Una vez aplicada la reoxigenación, la actividad poblacional del bulbo olfatorio aumentó inicialmente a niveles incluso superiores a los observados en condiciones basales (Figuras 8-A y 9), para después disminuir paulatinamente hasta estabilizarse en niveles similares a los observados en condiciones basales. La potencia de la actividad poblacional del bulbo olfatorio minutos después de iniciadas las condiciones de reoxigenación fue de  $23.495 \pm 7.699 \mu V^2$  (Tabla 3; Figura 9). Por último, como ya se ha mostrado en otros experimentos, la aplicación de lidocaína redujo la amplitud de la actividad poblacional del bulbo olfatorio a  $2.728 \pm 1.430 \mu V^2$  (Tabla 3; Figura 9). El análisis de las frecuencias fundamentales muestra una correlación en la banda de frecuencia gamma durante el periodo de reoxigenación (Figura 8D).



**Figura 8. Respuesta de la actividad de campo de la capa granular del bulbo olfatorio del ratón a la hipoxia/reoxigenación.** **A.** Trazo comprimido de la actividad poblacional del bulbo olfatorio (trazo superior) antes y durante la aplicación de 15 minutos de hipoxia, seguidos de 60 minutos de reoxigenación. En la parte inferior se muestran 2 trazos expandidos 1) del segmento correspondiente a la condición de hipoxia (izquierda) y 2) el trazo expandido correspondiente a la fase inicial de la reoxigenación (derecha). **B.** Se muestran los espectros de potencia correspondientes a los periodos de hipoxia (derecha) y al periodo de reoxigenación (izquierda). **C.** Espectrogramas de la actividad de la capa granular del bulbo olfatorio durante la hipoxia (derecha, indicado por la flecha roja) y durante la reoxigenación (izquierda). **D.** Matrices de correlación de las frecuencias de la actividad del bulbo olfatorio durante la hipoxia (derecha) y durante la reoxigenación (izquierda).

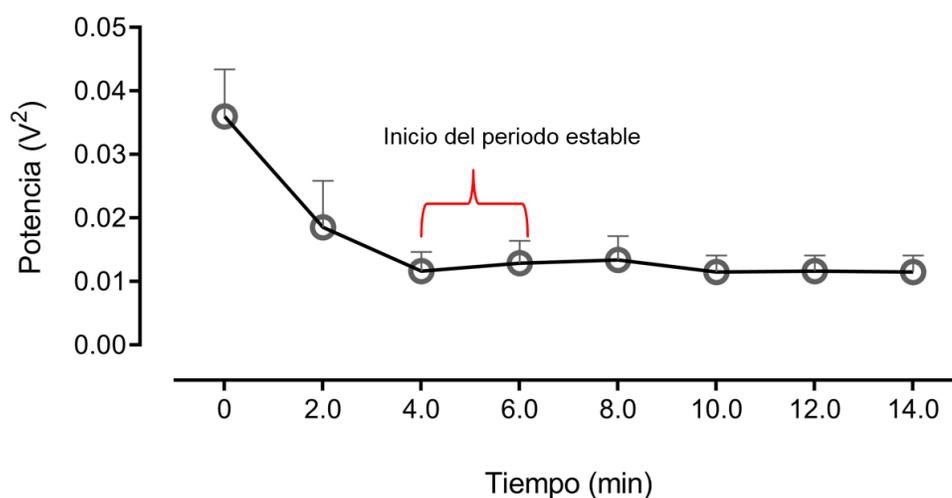
	Banda ancha ( $\mu V^2$ )	Theta ( $\mu V^2$ )	Beta ( $\mu V^2$ )	Gamma lento ( $\mu V^2$ )	Gamma rápido ( $\mu V^2$ )
Basal	7.247±1.391	4.983±1.369	1.810±0.295	0.227±0.041	0.559±0.254
Hipoxia	<b>3.253±1.370**</b>	2.579±1.265	0.430±0.100	<b>0.65±0.016***</b>	0.260±0.108
ReOx	<b>23.495±7.699**</b>	<b>16.215±6.116**</b>	<b>6.582±3.310***</b>	<b>0.725±0.333***</b>	0.725±0.323
Lidocaína	<b>2.728±1.430**</b>	2.261±1.326	<b>0.313±0.118***</b>	<b>0.046±0.013***</b>	0.197±0.094

**Tabla 3. Cambios en la potencia de la actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio ocasionado por la hipoxia-reoxigenación.** Se muestran las potencias para la banda ancha (1–120 Hz) y las bandas de frecuencia *theta*: 1-12Hz, *beta*: 12-30 Hz, *gamma* lento: 30-60Hz y *gamma* rápido: 60-120 Hz, en condiciones control y en los periodos de hipoxia / reoxigenación (ReOx). Los resultados en negritas indican diferencia significativa con respecto al control (P<0.01, prueba *Kruskal-Wallis*, *post hoc* comparación múltiple de *Student-Newman-Keuls*; n=6)



**Figura 9. Cuantificación de la respuesta de la actividad de campo de la capa granular del bulbo olfatorio de ratón a la hipoxia/reoxigenación.** Se cuantifica la potencia de la actividad del bulbo en la banda ancha (1–120 Hz) tanto en condiciones basales (normoxia), como en las condiciones de hipoxia y de re-oxigenación en rebanadas control (sin ningún tratamiento farmacológico). \*\*/\*\* denota una diferencia estadísticamente significativa entre las barras unidas por las líneas horizontales (Test: *Kruskal-Wallis*; Post hoc: *Student-Newman-Keuls*; P<0.050; n=6).

Una vez caracterizada la respuesta del bulbo olfatorio a la hipoxia y la reoxigenación, procedimos a evaluar los efectos del NaHS durante las condiciones de hipoxia. Para determinar si existen diferencias debidas a la temporalidad de la aplicación de ambas manipulaciones, se procedió a evaluarlas en dos condiciones: en el protocolo 1 la aplicación de hipoxia se aplicó hasta alcanzar su efecto estable (por 6 minutos) y, en presencia de hipoxia, se añadió el NaHS (Figura 11). En el protocolo 2 la hipoxia y el NaHS se aplicaron de manera simultánea (Figura 12).



**Figura 10. Curso temporal de la respuesta del bulbo olfatorio de ratón a la hipoxia.** La potencia de la actividad de la capa granular del bulbo olfatorio durante el periodo hipoxia; fue cuantificada cada 2 minutos. Se observa que el efecto depresor producido por la hipoxia sobre la potencia de la actividad poblacional del bulbo olfatorio fue rápido y alcanzó un punto estable entre 4-6 minutos (n=8).

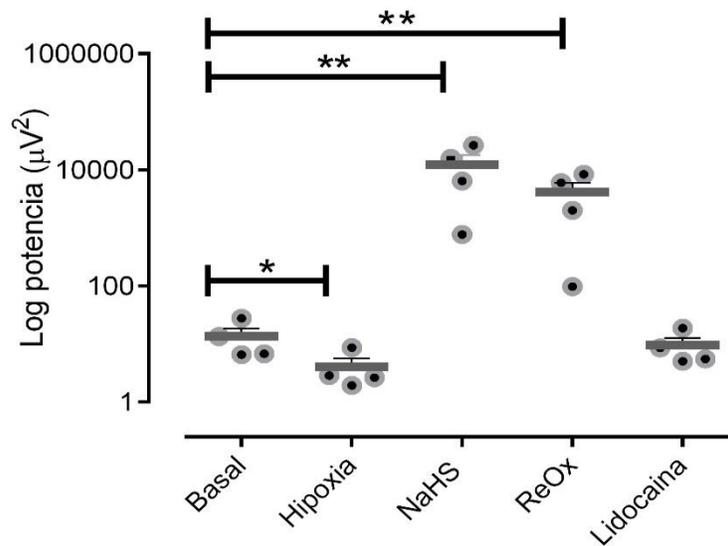
Con la finalidad de evaluar el efecto del NaHS en condiciones de hipoxia en el protocolo 1, fue necesario caracterizar la temporalidad del efecto de la hipoxia sobre la actividad poblacional del bulbo olfatorio en las rebanadas control (en ausencia de fármaco; Figura 10). En estos experimentos se observó que el tiempo que tarda la hipoxia en producir una inhibición estable de la potencia de la actividad del bulbo olfatorio fue de aproximadamente 4 minutos, cuando se observó una depresión que permanece estable por el resto del reto hipóxico (14 minutos; Figura 10). En estas rebanadas, la potencia de la actividad espontánea de bulbo olfatorio previa al inicio

de la hipoxia fue de  $7.183 \pm 1.181 \mu V^2$ . Esta potencia se reduce a  $2.339 \pm 0.395 \mu V^2$  a los 4 minutos de la hipoxia y se mantiene reducida en  $2.342 \pm 0.211 \mu V^2$  hasta el final del periodo de hipoxia (14 minutos). Por lo anterior, se estableció el periodo del minuto 4 al minuto 6 de la hipoxia, como el periodo estable, para la administración del NaHS.

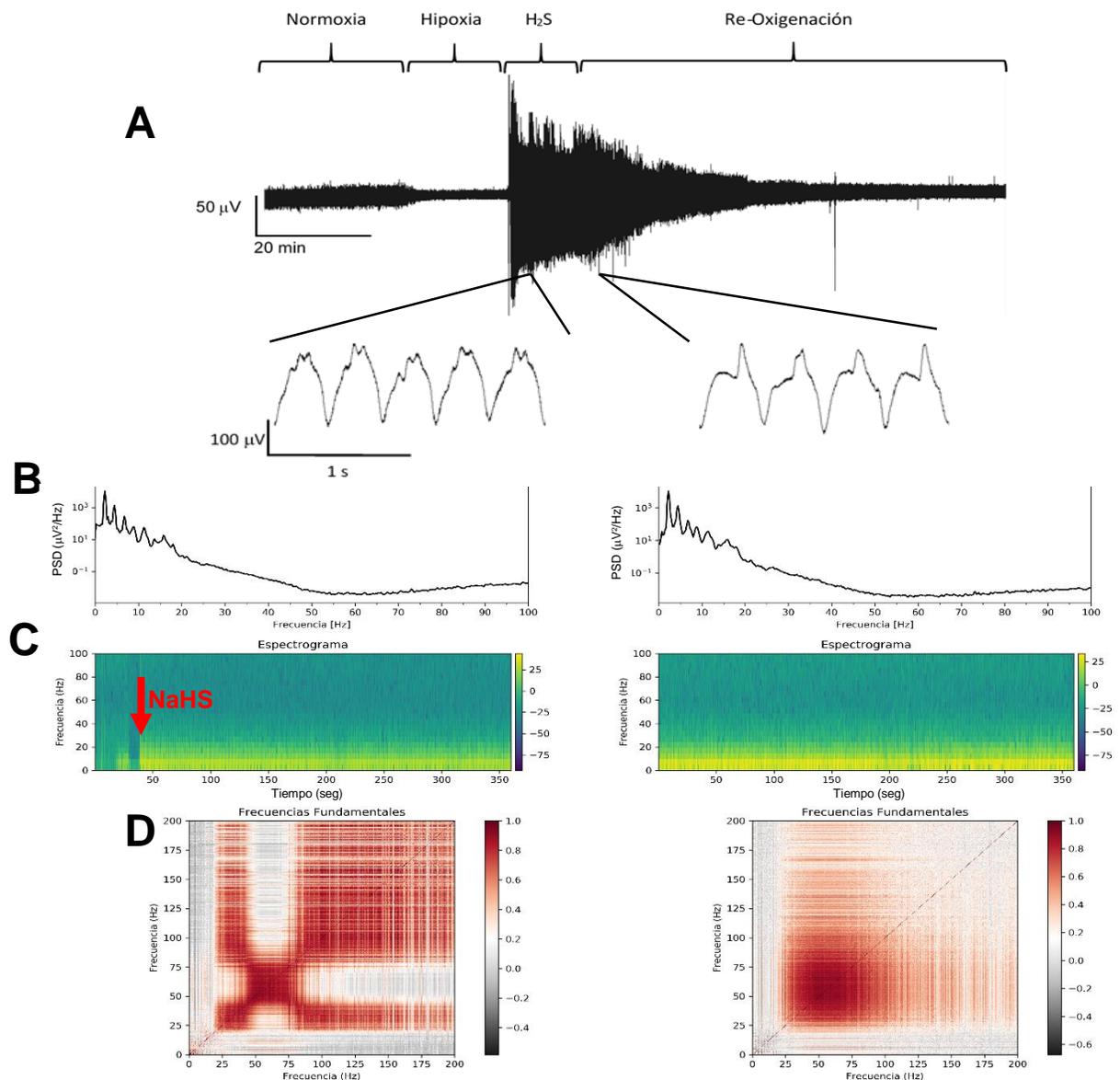
En los experimentos para evaluar el efecto del NaHS en condiciones de hipoxia en el protocolo 1, se observó que la hipoxia redujo la actividad del bulbo olfatorio de  $8.404 \pm 1.489 \mu V^2$  en condiciones de normoxia a  $3.398 \pm 1.417 \mu V^2$  en 4-6 min de hipoxia (Tabla 4). En presencia de la respuesta estable a la hipoxia, la aplicación de NaHS incrementó la actividad del bulbo olfatorio a  $12344.901 \pm 5031.109 \mu V^2$ , lo que es mayor al incremento inducido por la misma concentración de NaHS en la normoxia (Tabla 2). Además, la aplicación de la reoxigenación, que coincidió con la desaparición del efecto del NaHS, redujo la actividad del bulbo olfatorio a  $5110.160 \pm 1675.681 \mu V^2$ , cuando se midió 9 minutos después del inicio de la reoxigenación (Tabla 4). Por último, como ya se ha mostrado en otros experimentos, la aplicación de lidocaína reduce la amplitud de la actividad poblacional del bulbo olfatorio a  $5.299 \pm 2.883 \mu V^2$  (Tabla 4). En estos experimentos, durante el periodo estable del efecto de la hipoxia, el NaHS indujo un aumento en la amplitud de la actividad del bulbo olfatorio principalmente en las frecuencias de 1-20 Hz (Figura 12-B,C). En estas condiciones se puede observar la existencia de correlación en las bandas de frecuencia de *theta*, *beta* y *gamma* (Figura 12-D).

	Banda ancha ( $\mu V^2$ )	Theta ( $\mu V^2$ )	Beta ( $\mu V^2$ )	Gamma lento ( $\mu V^2$ )	Gamma rápido ( $\mu V^2$ )
<b>Basal</b>	8.404±1.489	7.03±2.31	3.726±1.776	1.106±0.425	2.276±0.729
<b>Hipoxia</b>	<b>3.398±1.417*</b>	<b>1.858±0.637**</b>	0.925±0.283	0.348±0.128	0.980±0.411
<b>H2S</b>	<b>12344.901 ±5031.109 **</b>	<b>12211.031 ±4968.840 **</b>	<b>165.891 ±81.090**</b>	2.959±1.097	1.487±0.490
<b>ReOx</b>	<b>5110.160 ±1675.681**</b>	<b>4089.735 ±1668.571 **</b>	<b>44.390±19.391**</b>	0.724±0.190	<b>0.644±0.092*</b>
<b>Lidocaína</b>	5.299±2.883	8.529±2.845	0.408±0.023	0.190±0.020	<b>0.466±0.048*</b>

**Tabla 4. Actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio en presencia de NaHS durante la fase estable de la hipoxia y la reoxigenación (Protocolo 1).** Se muestran la potencia en la banda ancha (1–120 Hz) y en las bandas de frecuencia *theta*: 1-12Hz, *beta*: 12-30 Hz, *gamma* lento: 30-60 Hz y *gamma* rápido: 60-120 Hz en condiciones control (sin ninguna intervención), en la condición de hipoxia, en presencia de NaHS (3 mM) y en la condición de reoxigenación (ReOX) en las rebanadas de bulbo olfatorio de ratón. Los resultados en negritas indican diferencia significativa con respecto al control (\*\*=P<0.01, prueba Kruskal-Wallis, post hoc comparación múltiple de Student Newman Keuls; n=4).



**Figura 11. Actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio en presencia de NaHS durante la fase estable de la hipoxia y la reoxigenación (Protocolo 1).** Se cuantifica la potencia de la actividad del bulbo en la banda ancha (1–120 Hz) en condiciones de normoxia (Basal), en el periodo estable de la hipoxia (a los 4 minutos), así como durante la aplicación de NaHS 3 mM, reoxigenación y lidocaína 1 mM. Se denota que existe diferencia significativa al comparar las respuestas de: Hipoxia Vs NaHS Vs ReOx Vs NaHS (P<0.01; Test: Kruskal-Wallis con post hoc de Student-Newman-Keuls; n= 4).



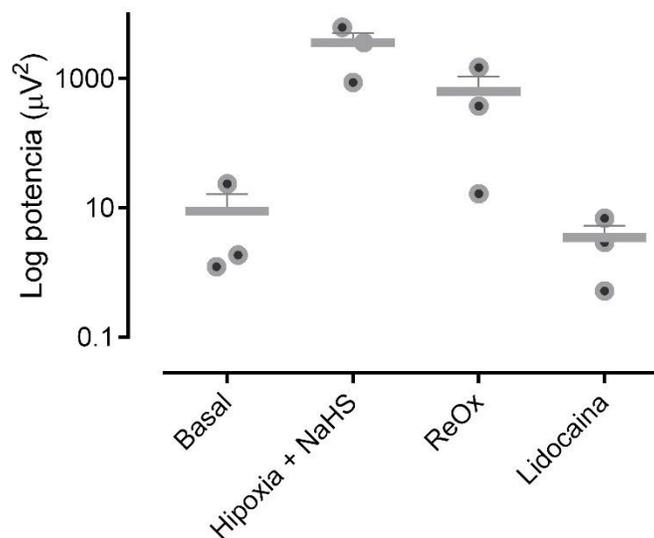
**Figura 12. Actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio en presencia de NaHS durante la fase estable de la hipoxia y la reoxigenación (Protocolo 1).** **A.** Se muestra el trazo comprimido de la actividad poblacional del bulbo olfatorio (trazo superior) durante 150 minutos, durante los cuales se aplicaron 6 minutos de hipoxia, seguidos de la administración de NaHS (3 mM) por 6 minutos y después 60 minutos de reoxigenación. En la parte inferior se muestran 2 trazos expandidos 1) del segmento correspondiente a la administración de NaHS (izquierda) y 2) el trazo expandido correspondiente a la fase de la re-oxigenación (derecha). **B.** Se muestran los espectros de potencia correspondientes a la administración de NaHS (derecha) y al periodo de reoxigenación (izquierda) con una ventana temporal de 6 minutos. **C.** Espectrogramas de la actividad de la capa granular del bulbo olfatorio en presencia de NaHS y en condición de reoxigenación (izquierda) con una ventana temporal de 6 minutos. **D.** Matrices de correlación de las frecuencias de la actividad del bulbo olfatorio en presencia de NaHS (derecha) y en condición de reoxigenación (izquierda).

En la evaluación de los efectos del NaHS durante la hipoxia en el protocolo 2, se observó que la aplicación simultánea de hipoxia y NaHS aumentó la potencia de la actividad del bulbo olfatorio de  $8.888 \pm 5.689 \mu V^2$  en condiciones de normoxia a  $3562.897 \pm 1190.478 \mu V^2$  (Tabla 5; Figura 13). Este incremento en la potencia de la actividad del bulbo olfatorio producido por la aplicación simultánea de hipoxia y NaHS fue mayor al incremento inducido por la misma concentración de NaHS en condiciones de normoxia (Tabla 2). La aplicación de la reoxigenación de manera simultánea a la disminución del efecto del NaHS redujo la actividad del bulbo olfatorio a  $627.366 \pm 343.512 \mu V^2$  (Tabla 5). Por último, como ya se ha mostrado en otros experimentos, la aplicación de lidocaína redujo la potencia de la actividad poblacional del bulbo olfatorio a  $3.444 \pm 1.439 \mu V^2$  (Tabla 5; Figura 13).

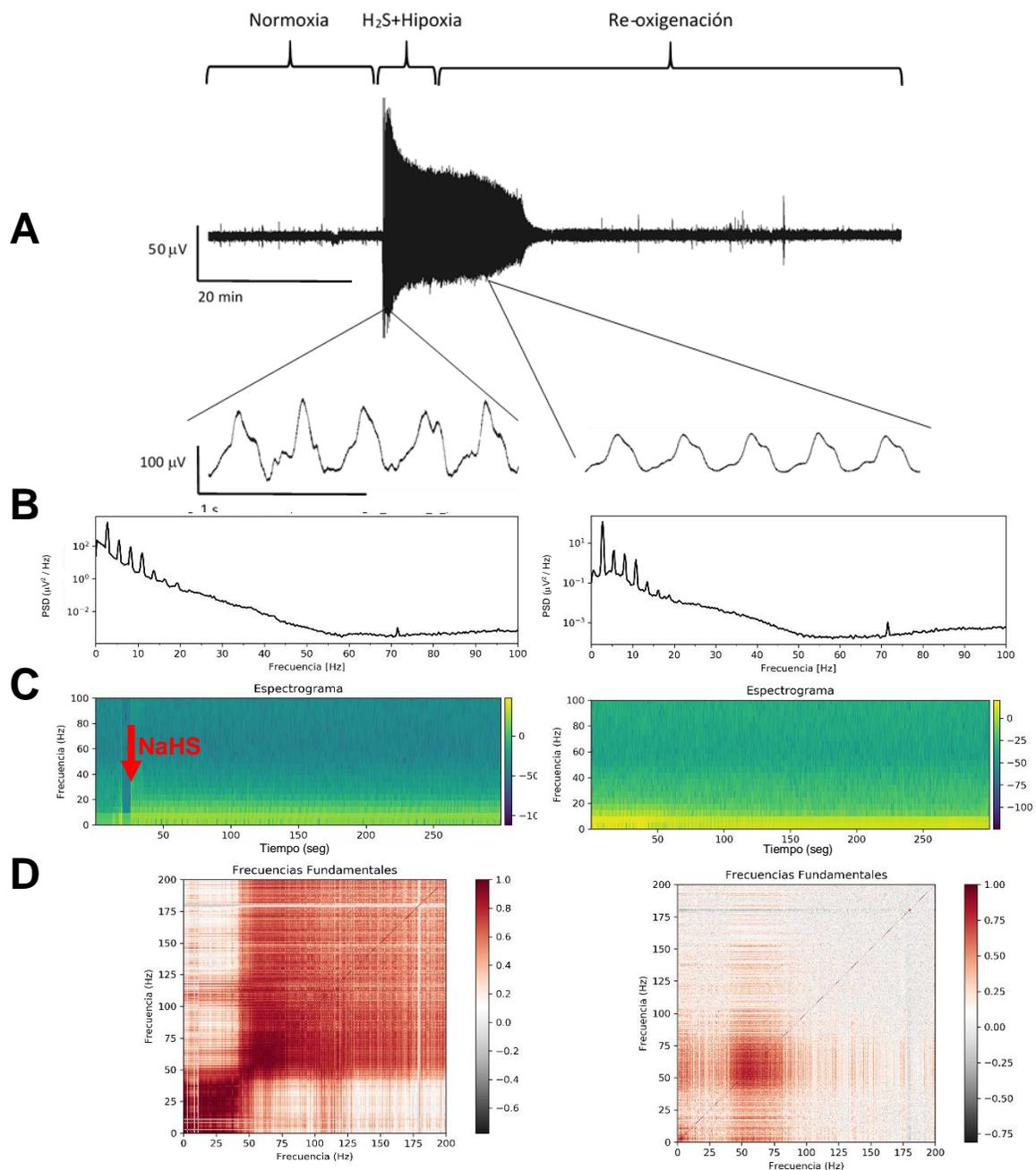
El análisis espectral del efecto de la aplicación simultánea del NaHS y la hipoxia muestra que esta manipulación produce un aumento en la potencia en las frecuencias de 1-20 Hz que se mantuvo hasta el periodo de reoxigenación (Figura 14-B). En estas condiciones se puede observar la existencia de correlación en las bandas de frecuencia de *theta*, *beta* y *gamma* (Figura 14-D) en los periodos de administración de NaHS e hipoxia. Sin embargo, la correlación disminuyó durante la reoxigenación.

	Banda ancha ( $\mu V^2$ )	Theta ( $\mu V^2$ )	Beta ( $\mu V^2$ )	Gamma Lento ( $\mu V^2$ )	Gamma Rápido ( $\mu V^2$ )
Basal	8.888±5.689	5.29±3.374	3.287±2.129	0.503±0.323	0.252±0.154
Hipoxia + NaHS	3562.897 ±1190.478	3551.493 ±1192.774	<b>12.522</b> <b>±2.079**</b>	0.456 ±0.115	1.028 ±0.361
ReOx	627.366± 343.512	625.511± 343.278	1.969± 0.402	0.190± 0.041	0.083± 0.010
Lidocaína	3.444±1.439	3.057±1.305	0.342±0.135	0.054±0.019	0.037±0.008

**Tabla 5. Actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio antes y durante la aplicación simultánea de NaHS e hipoxia, así como la reoxigenación (Protocolo 2).** Se muestran la potencia en la banda ancha (1–120 Hz) y en las bandas de frecuencia *theta*: 1-12Hz, *beta*: 12-30 Hz, *gamma* lento: 30-60 Hz y *gamma* rápido: 60-120 Hz en condiciones control (sin ninguna intervención), en la condición de hipoxia y NaHS aplicados simultáneamente y en la condición de reoxigenación (ReOx) en las rebanadas de bulbo olfatorio de ratón. Los resultados denotan que no existe diferencia significativa con respecto al control (\*\*=P<0.01, prueba *Kruskal-Wallis*, *post hoc* comparación múltiple de *Student-Newman-Keuls*; n=3).



**Figura 13. Actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio antes y durante la aplicación simultánea de NaHS e hipoxia, así como la reoxigenación (Protocolo 2).** Se cuantifica la potencia de la actividad del bulbo en la banda ancha (1–120 Hz) antes y durante la aplicación simultánea de NaHS e hipoxia, así como la reoxigenación. Se denota que no existen diferencias significativas entre las condiciones (Test: *Kruskal-Wallis* con *post hoc* de *Student-Newman-Keuls*; n= 3).



**Figura 14 Actividad poblacional de la capa granular del bulbo olfatorio antes y durante la aplicación simultánea de NaHS e hipoxia, así como la reoxigenación (Protocolo 2).** **A.** Se muestra el trazo comprimido de la actividad poblacional del bulbo olfatorio (trazo superior) hipoxia simultáneamente a NaHS (3 mM), seguido de 60 minutos de reoxigenación. En la parte inferior se muestran 2 trazos expandidos 1) del segmento correspondiente a la administración de NaHS e hipoxia (izquierda) y 2) el trazo expandido correspondiente a la fase temprana de la re-oxigenación (derecha). **B.** Espectros de potencia correspondientes a la administración de NaHS simultáneamente a la hipoxia (derecha) y al periodo de reoxigenación (izquierda). **C.** Espectrogramas de la actividad de la capa granular del bulbo olfatorio en presencia de NaHS simultáneamente a la hipoxia (izquierda) y en condición de reoxigenación (derecha). **D.** Matrices de correlación de las frecuencias de la actividad del bulbo olfatorio correspondientes a la administración de NaHS simultáneamente a la hipoxia (derecha) y al periodo de reoxigenación (izquierda).

## Discusión

En el presente estudio, realizado mediante la técnica de registro de campo (Alvarado-Martínez et al., 2013; Cornejo-Montes-de-Oca et al., 2018; Peña et al., 2010), se demostró que el H<sub>2</sub>S aumenta la actividad poblacional del bulbo olfatorio y produce oscilaciones en diferentes bandas de frecuencia (theta, beta y gamma). También, se demostró que el H<sub>2</sub>S revierte la depresión de la actividad poblacional inducida por la hipoxia y que la actividad oscilatoria inducida por el H<sub>2</sub>S es resistente a la hipoxia. A continuación, se discutirán los procesos celulares modulados por el H<sub>2</sub>S y que podrían explicar el aumento en la potencia y la producción de oscilaciones en el bulbo olfatorio. Además, se discutirá la modulación del bulbo olfatorio por el H<sub>2</sub>S en la condición de hipoxia

La literatura estima que los niveles endógenos de H<sub>2</sub>S en el cerebro podrían ser de 10nM a 160nM (Furne et al., 2008; Ishigami et al., 2009). Debido a la alta volatilidad del H<sub>2</sub>S (Levitt et al., 2011; DeLeon et al., 2012), en este estudio se decidió administrar el H<sub>2</sub>S mediante el uso de NaHS, un donador rápido de H<sub>2</sub>S (Levitt et al., 2011). La administración de NaHS resulta en la formación de HS<sup>-</sup> y H<sub>2</sub>S (Levitt et al., 2011). Cuando se utiliza un sistema cerrado, sólo entre un 6-33% del NaHS administrado en solución se convierte en H<sub>2</sub>S (Levitt et al., 2011). Por lo tanto, la concentración de H<sub>2</sub>S en el sistema es solo una fracción de la administración total del NaHS. Otro aspecto importante a considerar, para tener una aproximación de la cantidad de H<sub>2</sub>S alcanzada en los experimentos de esta tesis, es la volatilidad que presenta el gas H<sub>2</sub>S en solución, especialmente en sistemas abiertos con oxigenación por burbujeo, como el que se usó en nuestros experimentos. Este aspecto fue demostrado por el grupo de investigación encabezado por DeLeon, al medir la vida media del H<sub>2</sub>S y establecer un aproximado de 5 minutos (DeLeon et al., 2012). Con esta información, en nuestros experimentos se decidió iniciar con una concentración de 1mM de NaHS que resultaría en 60-330µM al ser colocado en el sistema de perfusión por gravedad. Posteriormente, esta cantidad de NaHS se reduciría al 50% (30-165µM) al pasar a la cámara de registro y ser constantemente burbujeada por carbógeno. De esta manera, consideramos que las

concentraciones utilizadas en esta tesis caen en rangos fisiológicos del H<sub>2</sub>S (Furne et al., 2008; Ishigami et al., 2009). Los espectrogramas correspondientes a la aplicación del NaHS mostraron que sus efectos tienen una latencia entre 18.540±0.244 y 28.700±1.800 segundos lo que es consistente con los experimentos realizados por DeLeon y colaboradores, quienes mostraron que el NaHS se disocia casi instantáneamente en solución para formar H<sub>2</sub>S. Esta reacción se completa en un 80% en los primeros 10 segundos y a los 20 segundos la concentración del H<sub>2</sub>S alcanza un máximo, para luego decaer exponencialmente (Deleon et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente, la actividad espontánea del bulbo olfatorio está determinada por las propiedades intrínsecas de sus elementos neuronales, así como por las interacciones sinápticas que establecen entre ellos (Brea et al., 2009; Corner, 2008). Por lo tanto, la combinación de las propiedades intrínsecas con las interacciones sinápticas las neuronas que componen un circuito le brindan la capacidad de generar patrones oscilatorios que se verán reflejados en el potencial local de campo (Yamamoto et al., 2012). En el bulbo olfatorio las sinapsis dendrodendríticas formada por las células granulares y las células mitrales / empenachadas resulta fundamental para el funcionamiento del bulbo olfatorio (Lagier et al., 2004). Como se mencionó anteriormente, el bulbo olfatorio tiene la capacidad de generar H<sub>2</sub>S de manera endógena, por la presencia de la enzima 3-MST en las capas mitral, glomerular y plexiforme externa (Shibuya et al., 2009). Se sabe que la enzima 3-MST se localiza en la mitocondria y en las sinapsis (Shibuya et al., 2009), por lo tanto, se sugiere que esta enzima y su producto, el H<sub>2</sub>S, regulan la actividad recíproca entre las neuronas mitrales/empenachadas y las neuronas granulares (Nagai et al., 2004).

La capacidad del H<sub>2</sub>S para modular la actividad poblacional en el bulbo olfatorio y otros circuitos neuronales, puede deberse a su acción sobre canales de Ca<sup>2+</sup> y diversos otros canales iónicos que resultan determinantes para la excitabilidad neuronal (Kuksis et al., 2015; Nagai et al., 2004). La función fisiológica mejor establecida de los canales de Ca<sup>2+</sup> es la regulación de la transmisión sináptica dependiente de Ca<sup>2+</sup> (Catterall, 2011). Además, las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo N regulan

la activación tónica neuronal (Wong et al., 2013). Por lo tanto, el H<sub>2</sub>S podría aumentar la excitabilidad de las neuronas y aumentar la probabilidad de activación tónica (Kuksis et al., 2015). La relevancia de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N en la transducción olfatoria se ha determinado al bloquearlos y observar que esta manipulación deriva en un estado de anosmia (Weiss et al., 2014).

Los circuitos en el cerebro poseen una capacidad notable para organizar actividades en diferentes escalas de tiempo. El bulbo olfatorio es un ejemplo clásico donde coexisten ritmos lentos (*theta*) y rápidos (*gamma*) (Fukunaga et al., 2014). Como ya se mencionó, el ritmo *gamma* se origina por la sinapsis bidireccional dendrodendrítica formada entre las células mitrales / empenachadas con las células granulares (Brea et al., 2009; Freeman, 1972; Kay et al., 2009; Lagier et al., 2004; Nusser et al., 2001; Fukunaga et al., 2014). Lo anterior, ha sido demostrado mediante modelos computacionales (Brea et al., 2009; Freeman, 1972), análisis de la densidad de corriente (Kay et al., 2009), farmacología (Lagier et al., 2004), modificaciones genéticas (Nusser et al., 2001) y optogenética (Fukunaga et al., 2014).

Cuando la excitabilidad de las células granulares es baja, la liberación de su neurotransmisor inhibitorio, mediada por canales NMDA y canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (por sus siglas en inglés, VDCC), también es baja, lo que permite que las células mitrales disparen en el rango de frecuencia gamma (Osinski et al., 2016). Cuando aumenta la excitabilidad de las células granulares también se incrementa la activación de los receptores NMDA y de los VDCC, lo cual inhibe el disparo de las células mitrales, por la liberación de GABA desde las neuronas granulares (Osinski et al., 2016). Por lo tanto, el flujo de Ca<sup>2+</sup> a través de los VDCC *per se* podría sostener oscilaciones poblacionales en el bulbo olfatorio (Osinski et al., 2016). El cambio entre las oscilaciones gamma y beta puede ser provocado por un aumento en el estado de excitabilidad de una subpoblación de células granulares (Osinski et al., 2016). Además, se sabe que la inhibición de los circuitos glomerulares locales originan a los ritmos lentos y, por otro lado, en la capa granular, los circuitos inhibitorios globales crean la coherencia temporal en el rango gamma

sugiriendo una disociación entre la inhibición "lenta" y "rápida" en el bulbo olfatorio (Fukunaga et al., 2014). Debido a que el H<sub>2</sub>S se genera de manera endógena en el bulbo olfatorio, a que este gas modula a los VDCC y a que, a su vez, estos canales están implicados en la generación de oscilaciones en las bandas de frecuencia theta, beta y gamma, podemos sugerir que el H<sub>2</sub>S tiene la capacidad de generar y orquestar las oscilaciones del bulbo olfatorio. Sin embargo, esto solo es una suposición ya que no realizamos experimentos con bloqueadores de canales. Además, podemos agregar que el aumento en la actividad poblacional que ocasiona el H<sub>2</sub>S podría deberse también a la modulación de canales de Na<sup>+</sup> (Kuksis et al., 2015) o a la potenciación en los receptores NMDA (Kimura, 2000).

En diferentes tipos celulares y circuitos neuronales el H<sub>2</sub>S modula a los receptores NMDA (Kimura, 2000) y a canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Lipscombe et al., 2004; Kuksis et al., 2015), lo que podría ser la base de la modulación que este gasotransmisor ejerce sobre el bulbo olfatorio, debido a que estos canales iónicos interactúan de manera sinérgica en las neuronas del bulbo olfatorio (Bywalez et al., 2015; Egger, 2008; Fekete et al., 2014; Hall et al., 2002; Ona-Jodar et al., 2017; Zylbertal et al., 2015). En las dendritas de muchas neuronas olfatorias bulbares la generación de potenciales de acción dependientes de canales de Na<sup>+</sup> recluta canales de Ca<sup>2+</sup> que generan mesetas despolarizantes que modula la entrada sináptica local y modulan la liberación de neurotransmisores, también localmente (Egger, 2008). Estas sinergias promueven la actividad recurrente entre los elementos del circuito bulbar (Bywalez et al., 2015; Egger, 2008; Fekete et al., 2014; Hall et al., 2002; Kelsch et al., 2012; Ona-Jodar et al., 2017; Zylbertal et al., 2015) y son fundamentales para la actividad de este circuito neuronal (Bywalez et al., 2015; Egger, 2005; Jerome et al., 2012; Marin et al., 2019; Ona-Jodar et al., 2017; Tank et al., 1994). De hecho, la interacción de los receptores NMDA con canales de es determinante de procesos de aprendizaje olfatorio (Jerome et al., 2012).

Una buena cantidad de neuronas olfatorias bulbares exhiben actividad rítmica sostenida por la interacción dinámica de una amplia variedad de canales iónicos incluidos canales de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Gorin et al., 2016; Vargas-Barroso et al., 2015;

Zhou et al., 2006) y se propone que estas neuronas son fundamentales para inducir y mantener la actividad oscilatoria poblacional del bulbo olfatorio (Gorin et al., 2016; Vargas-Barroso et al., 2015). Muchas neuronas olfatorias exhiben transitorios de  $Ca^{2+}$  rítmicos y sincronizados (Yuan et al., 2006)(Maslyukov et al., 2018), que pueden ser inhibidor por el bloqueo de canales de  $Na^+$  (Maslyukov et al., 2018).

El receptor NMDA es fundamental para el establecimiento, plasticidad y perseverancia dinámica de las conexiones entre las neuronas olfatorias bulbares (Breton-Provencher et al., 2014; Oswald et al., 2015). De hecho, una de las interacciones más fundamentales de la fisiología bulbar, la sinapsis dendrodendrítica, tanto en su aspecto excitatorio, como inhibitorio, es completamente dependiente del receptor NMDA (Chen et al., 2000; Christie et al., 2001; Isaacson, 1999; Mori et al., 1978; Schoppa et al., 2001). El receptor NMDA participa y se modifica en respuesta a la potenciación de la transmisión sináptica producida por la entrada olfatoria repetitiva y el aprendizaje olfatorio (Lethbridge et al., 2012). Sin embargo, es importante considerar que la potenciación de la actividad del receptor NMDA puede derivar en hiperexcitabilidad y daño neuronal (Igelström et al., 2011; Marin et al., 2019). Por ejemplo, un exceso de transmisión glutamatérgica a través del receptor NMDA puede afectar la función del bulbo olfatorio y la percepción de aromas (Marin et al., 2019). Además, el aumento de la actividad del receptor NMDA por la reducción en el contenido extracelular de magnesio induce actividad epileptiforme en rebanadas de bulbo olfatorio (Igelström et al., 2011; Puopolo et al., 2001), o de otros circuitos neuronales (Aram et al., 1988; Dreier et al., 1991; Tancredi et al., 1990), lo que en algunos aspectos, simula a la actividad inducida por el  $H_2S$  en nuestros experimentos (Igelström et al., 2011; Puopolo et al., 2001). El aumento de la actividad del receptor NMDA por la reducción en el contenido extracelular de magnesio induce actividad oscilatoria similar a la descrita en esta tesis (Igelström et al., 2011). De hecho, las oscilaciones de frecuencia baja, como las descritas en este estudio, pueden ser inducidas por la estimulación eléctrica de la entrada olfatoria o por la aplicación directa de NMDA (Schoppa et al., 2001; Sugai et al., 2005a, 2005b; Yuan et al., 2006). Sin embargo, la actividad oscilatoria inducida por la estimulación eléctrica de la entrada olfatoria,

en animales neonatos, puede también generarse en presencia de antagonistas de los receptores NMDA (que incluso la potencia) o no ser sensible al aumento de la actividad del receptor NMDA por la reducción en el contenido extracelular de magnesio (Schoppa et al., 2001; Sugai et al., 2005a, 2005b), siendo los receptores metabotrópicos de glutamato y los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  dendríticos rítmicos, pero no los canales de  $\text{Na}^+$ , candidatos probables para la inducción y mantenimiento de este tipo de oscilaciones independientes de los receptores NMDA (Yuan et al., 2006). Lo anterior, es importante para interpretar los resultados de esta tesis, pues fueron obtenidos en rebanadas provenientes de animales neonatos.

De acuerdo con nuestra hipótesis, en esta tesis encontramos que el  $\text{H}_2\text{S}$  tiene la capacidad de revertir la depresión de la actividad de campo del bulbo olfatorio producida por hipoxia. La hipoxia reduce la actividad poblacional del bulbo olfatorio debido a la disminución en la transmisión sináptica que produce tanto *in vivo* (Gervitz et al., 2003) como en modelos *in vitro* (Lipton et al., 1979) en diversas áreas del sistema nervioso central, como el hipocampo (Fowler et al., 2003), la corteza (Hentschel et al., 2003), el núcleo estriado (Centonze, 2001), y la medula espinal (Park et al., 2003). Esta inhibición de la neurotransmisión producida por la hipoxia afecta a los sistemas glutamatérgico (Pearson et al., 2004), GABAérgico (Centonze, 2001) y el colinérgico (Kása et al., 1997; Peña et al., 2005), los cuales son muy relevantes para el funcionamiento adecuado del bulbo olfatorio y para la generación de su actividad oscilatoria (Kay et al., 2009). Además, observamos que la administración de NaHS durante la hipoxia aumentó la actividad poblacional del bulbo olfatorio, incluso con una amplitud superior a la actividad registrada en condiciones de normoxia. Por lo que el NaHS no solo revierte la depresión de la actividad del bulbo olfatorio producida por la hipoxia, sino es capaz de aumentar la actividad poblacional más allá de la magnitud que tenía en condiciones pre-hipóxicas. El mecanismo por el cual la respuesta del NaHS fue mayor en condiciones de hipoxia, en comparación con su respuesta en condiciones de normoxia, escapa de los experimentos realizados en esta tesis. Sin embargo, es relevante mencionar que la hipoxia, *per se*, provoca la liberación de  $\text{H}_2\text{S}$  (Olson, 2013), por lo que podría haber una sinergia entre el  $\text{H}_2\text{S}$  liberado endógenamente

con aquel aplicado exógenamente que podría originar un aumento mayor en la amplitud de la actividad poblacional del bulbo olfatorio. Estos resultados coinciden con la prevención de los efectos de la hipoxia sobre otros circuitos neuronales (Li et al., 2016). Por ejemplo, el H<sub>2</sub>S evita la depresión respiratoria inducida por la hipoxia en animales anestesiados (Li et al., 2016) e *in vitro* (Nie et al., 2013; Pan et al., 2010, 2011), lo cual indica que el H<sub>2</sub>S evita la depresión, inducida por la hipoxia, de la actividad de los circuitos neuronales encargados de la generación y el control de la respiración en el tallo cerebral (Li et al., 2016; Nie et al., 2013; Pan et al., 2010, 2011). También, nuestros resultados coinciden con la prevención de los efectos neuroprotectores que el H<sub>2</sub>S genera en modelos de isquemia *in vitro* (Murakami et al., 2017) e *in vivo* (Murakami et al., 2017). Por ejemplo, el H<sub>2</sub>S protege a células de neuroblastoma (SH-SY5Y) y a neuronas corticales primarias contra la privación de glucosa y oxígeno *in vitro* (Murakami et al., 2017; Tay et al., 2010) o a neuronas *in vivo* sometidas a isquemia–reperfusión cerebral (Murakami et al., 2017). Lo que dependió de la formación de tiosulfato y de la inhibición de la caspasa-3 (Murakami et al., 2017) o de la activación de la vía canales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP / PKC / ERK1/2 / Hsp90 (Tay et al., 2010). El H<sub>2</sub>S protege a células de origen neural PC12 contra la hipoxia a través de la vía p38MAPK-iNOS o de la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno y de la activación de ERK1/2 (Lan et al., 2013, 2011). El H<sub>2</sub>S protege a las neuronas del hipocampo en cultivo contra la hipoxia-reoxigenación a través de la activación de una vía de señalización de supervivencia celular mediada por cAMP / PI3K / Akt / p70S6K (Shao et al., 2011). El H<sub>2</sub>S protege a la neurogénesis hipocampal contra su reducción inducida por la hipoxia (Liu et al., 2014), lo que se ve reflejado en una mejora en la cognición (Liu et al., 2014). El H<sub>2</sub>S protege a las neuronas del hipocampo contra la apoptosis inducida por hipoxia a través de la reducción de especies reactivas de oxígeno y del incremento del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Luo et al., 2012).

## Conclusiones

- El H<sub>2</sub>S aumenta la actividad poblacional del bulbo olfatorio y produce oscilaciones en las bandas de frecuencia theta, beta y gamma.
- El H<sub>2</sub>S revierte la depresión de la actividad poblacional inducida por la hipoxia y la actividad oscilatoria inducida por el H<sub>2</sub>S es resistente a la hipoxia.

## Perspectivas

- Comprobar la participación de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje.
- Comprobar la participación de los receptores NMDA.
- Realizar un estudio con una matriz de multielectrodos (MEAS).

## Referencias

1. Abe, K., Kimura, H., 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 16, 1066–71. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
2. Allison, A.C., 1953. The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biol. Rev.* 28, 195–244. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1953.tb01376.x>
3. Altundağ, A., Salihoglu, M., Çayönü, M., Cingi, C., Tekeli, H., Hummel, T., 2014. The effect of high altitude on olfactory functions. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* 271, 615–618. <https://doi.org/10.1007/s00405-013-2823-3>
4. Alvarado-Martínez, R., Salgado-Puga, K., Peña-Ortega, F., 2013. Amyloid Beta Inhibits Olfactory Bulb Activity and the Ability to Smell. *PLoS One* 8, 38–40. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075745>
5. Aram, J.A., Lodge, D., 1988. Validation of a neocortical slice preparation for the study of epileptiform activity. *J. Neurosci. Methods* 23, 211–24. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(88\)90005-2](https://doi.org/10.1016/0165-0270(88)90005-2)
6. Arevian, A.C., Kapoor, V., Urban, N.N., 2008. Activity-dependent gating of lateral inhibition in the mouse olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 11, 80–7. <https://doi.org/10.1038/nn2030>
7. Arieli, R., 1990. Can the rat detect hypoxia in inspired air? *Respir. Physiol.* 79, 243–253. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(90\)90130-Q](https://doi.org/10.1016/0034-5687(90)90130-Q)
8. Berridge, M.J., 1998. Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* 21, 13–26. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80510-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80510-3)
9. Bigdaj, E. V., Bezgacheva, E.A., Samojlov, V.O., Korolyev, Y.N., 2018. The Effects of Hypoxic Hypoxia on Olfactory Sensitivity in Humans. *Biophys. (Russian Fed.)* 63, 463–468. <https://doi.org/10.1134/S000635091803003X>
10. Bleymehl, K., Pérez-Gómez, A., Omura, M., Moreno-Pérez, A., Macías, D., Bai, Z., Johnson, R.S., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., Mombaerts, P., 2016. A Sensor for Low Environmental Oxygen in the Mouse Main Olfactory Epithelium. *Neuron* 92, 1196–1203. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.001>
11. Blitzer, R.D., Wong, T., Nouranifar, R., Iyengar, R., Landau, E.M.,

1995. Postsynaptic CAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron* 15, 1403–1414. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90018-7)

12. Bowyer, S.M., 2016. Coherence a measure of the brain networks: past and present. *Neuropsychiatr. Electrophysiol.* 2, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40810-015-0015-7>

13. Brea, J.N., Kay, L.M., Kopell, N.J., 2009. Biophysical model for gamma rhythms in the olfactory bulb via subthreshold oscillations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21954–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910964106>

14. Bressler, S.L., Kelso, J.A.S., 2001. Cortical coordination dynamics and cognition. *Trends Cogn. Sci.* [https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(00\)01564-3](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(00)01564-3)

15. Breton-Provencher, V., Coté, D., Saghatelian, A., 2014. Activity of the principal cells of the olfactory bulb promotes a structural dynamic on the distal dendrites of immature adult-born granule cells via activation of NMDA receptors. *J. Neurosci.* 34, 1748–1759. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3013-13.2014>

16. Bywalez, W.G., Patirniche, D., Rupprecht, V., Stemmler, M., Herz, A.V.M., Pálfi, D., Rózsa, B., Egger, V., 2015. Local postsynaptic voltage-gated sodium channel activation in dendritic spines of olfactory bulb granule cells. *Neuron* 85, 590–601. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.051>

17. Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>

18. Centonze, D., 2001. Adenosine-mediated inhibition of striatal GABAergic synaptic transmission during in vitro ischaemia. *Brain* 124, 1855–1865. <https://doi.org/10.1093/brain/124.9.1855>

19. Chen, W.R., Xiong, W., Shepherd, G.M., 2000. Analysis of Relations between NMDA Receptors and GABA Release at Olfactory Bulb Reciprocal Synapses. *Neuron* 25, 625–633. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81065-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81065-X)

20. Christie, J.M., Schoppa, N.E., Westbrook, G.L., 2001. Tufted cell dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is dependent on NMDA receptor activity. *J. Neurophysiol.* 85, 169–173. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.1.169>

21. Clark, W.L., 1957. Inquiries into the anatomical basis of olfactory discrimination. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 146, 299–319.

<https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0013>

22. Connett, R.J., Honig, C.R., Gayeski, T.E., Brooks, G.A., 1990. Defining hypoxia: a systems view of VO<sub>2</sub>, glycolysis, energetics, and intracellular PO<sub>2</sub>. *J. Appl. Physiol.* 68, 833–42. <https://doi.org/10.1152/jappl.1990.68.3.833>

23. Cornejo-Montes-de-Oca, M., Hernandez-Soto, R., Arturo, I., Morado-Urbina, C., Peña-Ortega, F., 2018. Tolfenamic Acid Prevents Amyloid  $\beta$ -induced Olfactory Bulb Dysfunction In Vivo. *Curr. Alzheimer Res.* 15. <https://doi.org/10.2174/1567205015666180223091233>

24. Corner, M.A., 2008. Spontaneous neuronal burst discharges as dependent and independent variables in the maturation of cerebral cortex tissue cultured in vitro: a review of activity-dependent studies in live “model” systems for the development of intrinsically generated bioel. *Brain Res. Rev.* 59, 221–44. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.08.001>

25. Dawe, G.S., Han, S.P., Bian, J.S., Moore, P.K., 2008. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience* 152, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.008>

26. de Almeida, L., Idiart, M., Linster, C., 2013. A model of cholinergic modulation in olfactory bulb and piriform cortex. *J. Neurophysiol.* 109, 1360–1377. <https://doi.org/10.1152/jn.00577.2012>

27. Deleon, E.R., Stoy, G.F., Olson, K.R., 2012. Passive loss of hydrogen sulfide in biological experiments. *Anal. Biochem.* 421, 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.016>

28. Dreier, J.P., Heinemann, U., 1991. Regional and time dependent variations of low Mg<sup>2+</sup> induced epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Exp. brain Res.* 87, 581–96. <https://doi.org/10.1007/BF00227083>

29. Drobyshevsky, A., Robinson, A.M., Derrick, M., Wyrwicz, A.M., Ji, X., Englof, I., Tan, S., 2006. Sensory deficits and olfactory system injury detected by novel application of MEMRI in newborn rabbit after antenatal hypoxia-ischemia. *Neuroimage* 32, 1106–1112. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.06.002>

30. du Vigneaud, V., Hubert S, L., Harold A, C., 1934. The oxidation of the

sulfur of homocystine, methionine, and s-methylcysteine in the animal body. *J. Biol. Chem* 105, 481–490.

31. Egger, V., 2008. Synaptic sodium spikes trigger long-lasting depolarizations and slow calcium entry in rat olfactory bulb granule cells. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2066–2075. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06170.x>

32. Egger, V., 2005. Dendrodendritic Synaptic Signals in Olfactory Bulb Granule Cells: Local Spine Boost and Global Low-Threshold Spike. *J. Neurosci.* 25, 3521–3530. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4746-04.2005>

33. Enokido, Y., Suzuki, E., Iwasawa, K., Namekata, K., Okazawa, H., Kimura, H., 2005. Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *FASEB J.* 19, 1854–6. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3724fje>

34. Fekete, A., Johnston, J., Delaney, K.R., 2014. Presynaptic T-type Ca<sup>2+</sup> channels modulate dendrodendritic mitral-mitral and mitral-periglomerular connections in mouse olfactory bulb. *J. Neurosci.* 34, 14032–14045. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0905-14.2014>

35. Felton, J.S., 1997. The heritage of Bernardino Ramazzini. *Occup. Med. (Chic. Ill).* 47, 167–179. <https://doi.org/10.1093/occmed/47.3.167>

36. Firestein, S., 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211–8. <https://doi.org/10.1038/35093026>

37. Fontanini, A., Bower, J.M., 2006. Slow-waves in the olfactory system: an olfactory perspective on cortical rhythms. *Trends Neurosci.* 29, 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.06.013>

38. Fowler, J.C., Gervitz, L.M., Hamilton, M.E., Walker, J.A., 2003. Systemic Hypoxia and the Depression of Synaptic Transmission in Rat Hippocampus after Carotid Artery Occlusion. *J. Physiol.* 550, 961–972. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.039594>

39. Freeman, W.J., 1972. Waves, Pulses, and the Theory of Neural Masses. *Prog. Theor. Biol.* 2, 1–10.

40. Friedman, D., Strowbridge, B.W., 2000. Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. *J. Neurophysiol.* 84, 39–50.

<https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.1.39>

41. Fukunaga, I., Herb, J.T., Kollo, M., Boyden, E.S., Schaefer, A.T., 2014. Independent control of gamma and theta activity by distinct interneuron networks in the olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 17, 1208–1216. <https://doi.org/10.1038/nn.3760>

42. Furne, J., Saeed, A., Levitt, M.D., 2008. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90566.2008>

43. Gervitz, L., Davies, D., Omidvar, K., Fowler, J., 2003. The effect of acute hypoxemia and hypotension on adenosine-mediated depression of evoked hippocampal synaptic transmission. *Exp. Neurol.* 182, 507–517. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00160-2)

44. Goodwin, L.R., Francom, D., Dieken, F.P., Taylor, J.D., Warenycia, M.W., Reiffenstein, R.J., Dowling, G., 1989. Determination of Sulfide in Brain Tissue by Gas Dialysis/Ion Chromatography: Postmortem Studies and Two Case Reports. *J. Anal. Toxicol.* 13, 105–109. <https://doi.org/10.1093/jat/13.2.105>

45. Gorin, M., Tsitoura, C., Kahan, A., Watznauer, K., Drose, D.R., Arts, M., Mathar, R., O'Connor, S., Hanganu-Opatz, I.L., Ben-Shaul, Y., Spehr, M., 2016. Interdependent conductances drive infraslow intrinsic rhythmogenesis in a subset of accessory olfactory bulb projection neurons. *J. Neurosci.* 36, 3127–3144. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2520-15.2016>

46. Gray, C.M., Skinner, J.E., 1988. Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the waking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. *Exp. Brain Res.* 69, 378–386. <https://doi.org/10.1007/BF00247583>

47. Hall, B.J., Delaney, K.R., 2002. Contribution of a calcium-activated non-specific conductance to NMDA receptor-mediated synaptic potentials in granule cells of the frog olfactory bulb. *J. Physiol.* 543, 819–834. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.024638>

48. Han, Y., Qin, J., Chang, X., Yang, Z., Tang, X., Du, J., 2005. Hydrogen sulfide may improve the hippocampal damage induced by recurrent febrile seizures in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 431–436.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.028>

49. Hawkes, C.H., Doty, R.L., 2009. *The Neurology of Olfaction*. Cambridge University Press, Cambridge.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511575754>

50. Hentschel, S., Lewerenz, A., Nieber, K., 2003. Activation of A(3) Receptors by Endogenous Adenosine Inhibits Synaptic Transmission During Hypoxia in Rat Cortical Neurons. *Restor Neurol Neurosci* 1, 55–63.

51. Hine, C., Harputlugil, E., Zhang, Y., Ruckenstuhl, C., Lee, B.C., Brace, L., Longchamp, A., Treviño-Villarreal, J.H., Mejia, P., Ozaki, C.K., Wang, R., Gladyshev, V.N., Madeo, F., Mair, W.B., Mitchell, J.R., 2015. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* 160, 132–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.048>

52. Hosoki, R., Matsuki, N., Kimura, H., 1997. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 527–531.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6878>

53. Hu, L.F., Wong, P.T.H., Moore, P.K., Bian, J.S., 2007. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *J. Neurochem.* 100, 1121–1128.  
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04283.x>

54. Hudspith, M.J., 1997. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury, *British Journal of Anaesthesia*.  
<https://doi.org/10.1093/bja/78.6.731>

55. Huguenard, J.R., 1996. Low-Threshold Calcium Currents in Central Nervous System Neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 329–348.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.58.030196.001553>

56. Huppertz, T., Freiherr, J., Olzowy, B., Kisser, U., Stephan, J., Fesl, G., Haegler, K., Feddersen, B., Fischer, R., Mees, K., Becker, S., 2018a. Reduction of olfactory sensitivity during normobaric hypoxia. *Auris Nasus Larynx* 45, 747–752.  
<https://doi.org/10.1016/j.anl.2017.11.001>

57. Huppertz, T., Freiherr, J., Olzowy, B., Kisser, U., Stephan, J., Fesl, G.,

Haegler, K., Feddersen, B., Fischer, R., Mees, K., Becker, S., 2018b. Reduction of olfactory sensitivity during normobaric hypoxia. *Auris Nasus Larynx* 45, 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.anl.2017.11.001>

58. Igelström, K.M., Shirley, C.H., Heyward, P.M., 2011. Low-magnesium medium induces epileptiform activity in mouse olfactory bulb slices. *J. Neurophysiol.* 106, 2593–2605. <https://doi.org/10.1152/jn.00601.2011>

59. Isaacson, J.S., 1999. Glutamate spillover mediates excitatory transmission in the rat olfactory bulb. *Neuron* 23, 377–84.

60. Ishigami, M., Hiraki, K., Umemura, K., Ogasawara, Y., Ishii, K., Kimura, H., 2009. A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 205–14. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2132>

61. Jannasch, H.W., Wirsén, C.O., 1981. Morphological survey of microbial mats near deep-sea thermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 528–38.

62. Jerome, D., Hou, Q., Yuan, Q., 2012. Interaction of NMDA receptors and L-type calcium channels during early odor preference learning in rats. *Eur. J. Neurosci.* 36, 3134–3141. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08210.x>

63. Kaila, K., 1994. Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 42, 489–537. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)90049-3)

64. Kandel, J.H., 2013. *Principles of Neural Science* edited by Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, A. J. Hudspeth, and Sarah Mack, *The Quarterly Review of Biology*. The University of Chicago Press. <https://doi.org/10.1086/670559>

65. Kása, P., Rakonczay, Z., Gulya, K., 1997. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 52, 511–535. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00028-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00028-2)

66. Kawabata, A., Ishiki, T., Nagasawa, K., Yoshida, S., Maeda, Y., Takahashi, T., Sekiguchi, F., Wada, T., Ichida, S., Nishikawa, H., 2007. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain* 132, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.01.026>

67. Kay, L.M., 2014. Local Field Potential in Olfaction, in: Encyclopedia of Computational Neuroscience. Springer New York, New York, NY, pp. 1–7. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7320-6\\_721-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7320-6_721-1)
68. Kay, L.M., Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Libano, D., Kopell, N., 2009. Olfactory oscillations: the what, how and what for. *Trends Neurosci.* 32, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.008>
69. Kay, L.M., Lazzara, P., 2010. How global are olfactory bulb oscillations? *J. Neurophysiol.* 104, 1768–1773. <https://doi.org/10.1152/jn.00478.2010>
70. Kelsch, W., Li, Z., Eliava, M., Goengrich, C., Monyer, H., 2012. GluN2B-containing NMDA receptors promote wiring of adult-born neurons into olfactory bulb circuits. *J. Neurosci.* 32, 12603–12611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1459-12.2012>
71. Kemp, P.J., Lewis, A., Hartness, M.E., Searle, G.J., Miller, P., O’Kelly, I., Peers, C., 2002. Airway chemotransduction: From oxygen sensor to cellular effector. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, S17–S24. <https://doi.org/10.1164/rccm.2206009>
72. Kim, D., Hogan, J.O., White, C., 2020. Ca<sup>2+</sup> oscillations in rat carotid body type 1 cells in normoxia and hypoxia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 318, C430–C438. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00442.2019>
73. Kimura, H., 2014. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide* 41, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.01.002>
74. Kimura, H., 2012. Physiological and Pathophysiological Functions of Hydrogen Sulfide, in: *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 71–98. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30338-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30338-8_3)
75. Kimura, H., 2011. Hydrogen sulfide: Its production and functions. *Exp. Physiol.* 96, 833–835. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2011.057455>
76. Kimura, H., 2002. Hydrogen Sulfide as a Neuromodulator. *Mol. Neurobiol.* 26, 013–020. <https://doi.org/10.1385/MN:26:1:013>
77. Kimura, H., 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates

the NMDA receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 129–133. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1915>

78. Kimura, Y., Dargusch, R., Schubert, D., Kimura, H., 2006. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal.* 8, 661–670. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.661>

79. Kimura, Y., Kimura, H., 2004. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J.* 18, 1165–1167. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1815fje>

80. Knight, L.D., Presnell, S.E., 2005. Death by sewer gas: Case report of a double fatality and review of the literature. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* <https://doi.org/10.1097/01.paf.0000163834.87968.08>

81. Kombian, S.B., Reiffenstein, R.J., Colmers, W.F., 1993. The actions of hydrogen sulfide on dorsal raphe serotonergic neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 70, 81–96. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.1.81>

82. Kuehn, M., Welsch, H., Zahnert, T., Hummel, T., 2008. Changes of pressure and humidity affect olfactory function. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* 265, 299–302. <https://doi.org/10.1007/s00405-007-0446-2>

83. Kuksis, M., Ferguson, A. V., 2015. Actions of a hydrogen sulfide donor (NaHS) on transient sodium, persistent sodium, and voltage-gated calcium currents in neurons of the subfornical organ. *J. Neurophysiol.* 114, 1641–1651. <https://doi.org/10.1152/jn.00252.2015>

84. Lagier, S., Carleton, A., Lledo, P.-M., 2004. Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J. Neurosci.* 24, 4382–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5570-03.2004>

85. Lan, A., Liao, X., Mo, L., Yang, C., Yang, Z., Wang, X., Hu, F., Chen, P., Feng, J., Zheng, D., Xiao, L., 2011. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38mapk signaling pathways in PC12 cells. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025921>

86. Lan, A., Xu, W., Zhang, H., Hua, X., Zheng, D., Guo, R., Shen, N., Hu, F., Feng, J., Liu, D., 2013. Inhibition of ROS-activated p38MAPK pathway is involved in the protective effect of H<sub>2</sub>S against chemical hypoxia-induced

inflammation in PC12 cells. *Neurochem. Res.* 38, 1454–1466. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1044-x>

87. Lee, K., Roth, R.A., LaPres, J.J., 2007. Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol. Ther.* 113, 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.08.001>

88. Lee, S.W., Hu, Y.S., Hu, L.F., Lu, Q., Dawe, G.S., Moore, P.K., Wong, P.T.H., Bian, J.S., 2006. Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells. *Glia* 54, 116–124. <https://doi.org/10.1002/glia.20362>

89. Lethbridge, R., Hou, Q., Harley, C.W., Yuan, Q., 2012. Olfactory bulb glomerular nmda receptors mediate olfactory nerve potentiation and odor preference learning in the neonate rat. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035024>

90. Levitt, M.D., Abdel-Rehim, M.S., Furne, J., 2011. Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: Anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 373–378. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3525>

91. Li, H., Chen, L., Hou, X., Zhou, H., Zheng, Y., 2016. Hydrogen sulfide attenuates hypoxia-induced respiratory suppression in anesthetized adult rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 220, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2015.09.001>

92. Li, Q., Sun, B., Wang, X., Jin, Z., Zhou, Y., Dong, L., Jiang, L.H., Rong, W., 2010. A crucial role for hydrogen sulfide in oxygen sensing via modulating large conductance calcium-activated potassium channels. *Antioxidants Redox Signal.* 12, 1179–1189. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2926>

93. Lipscombe, D., Helton, T.D., Xu, W., 2004. L-type calcium channels: The low down. *J. Neurophysiol.* <https://doi.org/10.1152/jn.00486.2004>

94. Lipton, P., Whittingham, T.S., 1979. The effect of hypoxia on evoked potentials in the in vitro hippocampus. *J. Physiol.* 287, 427–438. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1979.sp012668>

95. Liu, D., Wang, Z., Zhan, J., Zhang, Qun, Wang, J., Zhang, Qingrui, Xian, X., Luan, Q., Hao, A., 2014. Hydrogen sulfide promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells and protects hypoxia-induced decrease

in hippocampal neurogenesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 116, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.009>

96. Llinás, R., 2002. I of the Vortex: From Neurons to Self, in: *Neurosurgery Quarterly - NEUROSURG QUART.*

97. Luo, Y., Liu, X., Zheng, Q., Wan, X., Ouyang, S., Yin, Y., Sui, X., Liu, J., Yang, X., 2012. Hydrogen sulfide prevents hypoxia-induced apoptosis via inhibition of an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-activated calcium signaling pathway in mouse hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.131>

98. Mainland, J., Sobel, N., 2006. The Sniff Is Part of the Olfactory Percept. *Chem. Senses* 31, 181–196. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjj012>

99. Malik, R., Ferguson, A. V., 2016. Hydrogen sulfide depolarizes neurons in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Brain Res.* 1633, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.029>

100. Marin, C., Laxe, S., Langdon, C., Alobid, I., Berenguer, J., Fuentes, M., Bernabeu, M., Mullol, J., 2019. Olfactory Training Prevents Olfactory Dysfunction Induced by Bulbar Excitotoxic Lesions: Role of Neurogenesis and Dopaminergic Interneurons. *Mol. Neurobiol.* 56, 8063–8075. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1639-6>

101. Martin, C., Gervais, R., Messaoudi, B., Ravel, N., 2006. Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: A network activity. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1801–1810. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04711.x>

102. Martin, C., Huitte, D., Guillermier, M., Petit, F., Bonvento, G., Gurden, H., 2012. Alteration of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice. *Front. Neural Circuits* 6, 1. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00001>

103. Masimore, B., Kakalios, J., Redish, A.D., 2004. Measuring fundamental frequencies in local field potentials. *J. Neurosci. Methods* 138, 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.03.014>

104. Maslyukov, A., Li, K., Su, X., Kovalchuk, Y., Garaschuk, O., 2018. Spontaneous calcium transients in the immature adult-born neurons of the olfactory

bulb. *Cell Calcium* 74, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.06.001>

105. McLean, J.H., Shipley, M.T., 1987. Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: I. Origins and laminar specificity of serotonergic inputs in the adult rat. *J. Neurosci.* 7, 3016–28.

106. McLean, J.H., Shipley, M.T., Nickell, W.T., Aston-Jones, G., Reyher, C.K., 1989. Chemoanatomical organization of the noradrenergic input from locus coeruleus to the olfactory bulb of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 285, 339–49. <https://doi.org/10.1002/cne.902850305>

107. Mori, K., Manabe, H., Narikiyo, K., Onisawa, N., 2013. Olfactory consciousness and gamma oscillation couplings across the olfactory bulb, olfactory cortex, and orbitofrontal cortex. *Front. Psychol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00743>

108. Mori, K., Takagi, S.F., 1978. An intracellular study of dendrodendritic inhibitory synapses on mitral cells in the rabbit olfactory bulb. *J. Physiol.* 279, 569–588. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1978.sp012362>

109. Mori, K., Takahashi, Y.K., Igarashi, K.M., Yamaguchi, M., 2006. Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev.* 86, 409–433. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2005>

110. Mouradian, L.E., Scott, J.W., 1988. Cytochrome oxidase staining marks dendritic zones of the rat olfactory bulb external plexiform layer. *J. Comp. Neurol.* 271, 507–18. <https://doi.org/10.1002/cne.902710404>

111. Murakami, Y., Ito, M., Ohsawa, I., 2017. Molecular hydrogen protects against oxidative stress-induced SH-SY5Y neuroblastoma cell death through the process of mitohormesis. *PLoS One* 12, e0176992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176992>

112. Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S.H., 2009. HS signals through protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.* 2, ra72. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>

113. Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J.I., Kimura, H., 2004. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J.* 18, 557–559.

<https://doi.org/10.1096/fj.03-1052fje>

114. Nie, L., Hu, Y., Yan, X., Li, M., Chen, L., Li, H., Li, X., Zhou, H., Zheng, Y., 2013. The anti-apoptotic effect of hydrogen sulfide attenuates injuries to the medullary respiratory centers of neonatal rats subjected to in utero cigarette smoke exposure. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 188, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.05.001>

115. Nusser, Z., Kay, L.M., Laurent, G., Homanics, G.E., Mody, I., 2001. Disruption of GABA(A) receptors on GABAergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *J. Neurophysiol.* 86, 2823–33. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.6.2823>

116. O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R., Arancio, O., 1991. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11285–11289. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11285>

117. Olson, K.R., 2013. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Clin. Chem. Lab. Med.* 51, 623–632. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0551>

118. Ona-Jodar, T., Gerkau, N.J., Aghvami, S.S., Rose, C.R., Egger, V., 2017. Stwo-photon Na<sup>+</sup> imaging reports somatically evoked action potentials in rat olfactory bulb mitral and granule cell neurites. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00050>

119. Osinski, B.L., Kay, L.M., 2016. Granule cell excitability regulates gamma and beta oscillations in a model of the olfactory bulb dendrodendritic microcircuit. *J. Neurophysiol.* 116, 522–539. <https://doi.org/10.1152/jn.00988.2015>

120. Oswald, M.J., Schulz, J.M., Kelsch, W., Oorschot, D.E., Reynolds, J.N.J., 2015. Potentiation of NMDA receptor-mediated transmission in striatal cholinergic interneurons. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 116. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00116>

121. Pan, J.-G., Hu, H.-Y., Zhang, J., Zhou, H., Chen, L., Tang, Y.-H., Zheng, Y., 2010. Protective effect of hydrogen sulfide on hypoxic respiratory suppression in medullary slice of neonatal rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 171, 181–6. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2010.04.006>

122. Pan, L.-L., Liu, X.-H., Gong, Q.-H., Zhu, Y.-Z., 2011. S-Propargyl-cysteine (SPRC) attenuated lipopolysaccharide-induced inflammatory response in H9c2 cells involved in a hydrogen sulfide-dependent mechanism. *Amino Acids* 41, 205–15. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0834-1>
123. Park, Y.K., Jung, S.J., Yoo, J.-E., Kwak, J., Lim, W., Kim, J., 2003. Effect of acute hypoxia on ATP-sensitive potassium currents in substantia gelatinosa neurons of juvenile rats. *Eur. J. Physiol.* 446, 600–606. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1113-0>
124. Pawar, A., Peng, Y.J., Jacono, F.J., Prabhakar, N.R., 2008. Comparative analysis of neonatal and adult rat carotid body responses to chronic intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 104, 1287–1294. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00644.2007>
125. Pearson, T., Frenguelli, B.G., 2004. Adrenoceptor subtype-specific acceleration of the hypoxic depression of excitatory synaptic transmission in area CA1 of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1555–1565. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03602.x>
126. Peña, F., Ordaz, B., Balleza-Tapia, H., Bernal-Pedraza, R., Márquez-Ramos, A., Carmona-Aparicio, L., Giordano, M., 2010. Beta-amyloid protein (25-35) disrupts hippocampal network activity: role of Fyn-kinase. *Hippocampus* 20, 78–96. <https://doi.org/10.1002/hipo.20592>
127. Peña, F., Ramirez, J.M., 2005. Hypoxia-induced changes in neuronal network properties. *Mol. Neurobiol.* 32, 251–283. <https://doi.org/10.1385/MN:32:3:251>
128. Peng, Y.J., Nanduri, J., Raghuraman, G., Souvannakitti, D., Gadalla, M.M., Kumar, G.K., Snyder, S.H., Prabhakar, N.R., 2010. H<sub>2</sub>S mediates O<sub>2</sub> sensing in the carotid body. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10719–10724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005866107>
129. Powell, C.R., Dillon, K.M., Matson, J.B., 2018. A review of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) donors: Chemistry and potential therapeutic applications. *Biochem. Pharmacol.* 149, 110–123. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.11.014>
130. Prabhakar, N.R., 2000. Oxygen sensing by the carotid body

chemoreceptors. *J. Appl. Physiol.* 88, 2287–2295.  
<https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.6.2287>

131. Prieto-Lloret, J., Shaifta, Y., Ward, J.P.T., Aaronson, P.I., 2015. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat pulmonary arteries is not inhibited by antagonists of H<sub>2</sub>S-synthesizing pathways. *J. Physiol.* 593, 385–401.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.277046>

132. Puopolo, M., Belluzzi, O., 2001. NMDA-dependent, network-driven oscillatory activity induced by bicuculline or removal of Mg<sup>2+</sup> in rat olfactory bulb neurons. *Eur. J. Neurosci.* 13, 92–102. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2001.01365.x>

133. Purves D, Augustine GJ, F.D., 2001. *Neuroscience*, 2nd editio. ed. Sinauer Associates, Sunderland (MA).

134. Qu, K., Chen, C.P.L.H., Halliwell, B., Moore, P.K., Wong, P.T.H., 2006. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke* 37, 889–893.  
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000204184.34946.41>

135. Ramazzini, B., 1700. *De Morbis Artificum Diatriba*. Mutinae (Modena).

136. Ressler, K.J., Sullivan, S.L., Buck, L.B., 1993. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73, 597–609.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90145-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90145-G)

137. Rizzo, A., 1967. The Possible Role of Hydrogen Sulfide in Human Periodontal Disease. I. Hydrogen Sulfide Production in Periodontal Pockets - PubMed. *Periodontics* 5, 233–6.

138. Roberson, E.D., David Sweatt, J., 1996. Transient activation of cyclic AMP-dependent protein kinase during hippocampal long-term potentiation. *J. Biol. Chem.* 271, 30436–30441. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30436>

139. Rojas-Líbano, D., Kay, L.M., 2012. Interplay between sniffing and odorant sorptive properties in the rat. *J. Neurosci.* 32, 15577–15589.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1464-12.2012>

140. Rojas-Líbano, D., Kay, L.M., 2008a. Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. *Cogn. Neurodyn.* 2, 179–194. <https://doi.org/10.1007/s11571-008-9053-1>

141. Rojas-Líbano, D., Kay, L.M., 2008b. Olfactory system gamma oscillations: The physiological dissection of a cognitive neural system. *Cogn. Neurodyn.* 2, 179–194. <https://doi.org/10.1007/s11571-008-9053-1>
142. Sakkalis, V., 2011. Review of advanced techniques for the estimation of brain connectivity measured with EEG/MEG. *Comput. Biol. Med.* 41, 1110–1117. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2011.06.020>
143. Schlessinger, J., 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211–225. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00114-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00114-8)
144. Schnitzler, A., Gross, J., 2005. Normal and pathological oscillatory communication in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* <https://doi.org/10.1038/nrn1650>
145. Schoenfeld, T.A., Macrides, F., 1984. Topographic organization of connections between the main olfactory bulb and pars externa of the anterior olfactory nucleus in the hamster. *J. Comp. Neurol.* 227, 121–35. <https://doi.org/10.1002/cne.902270113>
146. Schoppa, N.E., Westbrook, G.L., 2001. Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron* 31, 639–651. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00389-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00389-0)
147. Sen, N., Paul, B.D., Gadalla, M.M., Mustafa, A.K., Sen, T., Xu, R., Kim, S., Snyder, S.H., 2012. Hydrogen sulfide-linked sulfhydration of NF- $\kappa$ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol. Cell* 45, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.021>
148. Shao, J.L., Wan, X.H., Chen, Y., Bi, C., Chen, H.M., Zhong, Y., Heng, X.H., Qian, J.Q., 2011. H<sub>2</sub>S protects hippocampal neurons from anoxia-reoxygenation through cAMP-mediated PI3K/Akt/p70S6K cell-survival signaling pathways. *J. Mol. Neurosci.* 43, 453–460. <https://doi.org/10.1007/s12031-010-9464-4>
149. Shepherd, G.M., 1972. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev.* 52, 864–917. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.4.864>
150. Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H., 2009. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces

Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 703–714. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2253>

151. Shipley, M.T., Ennis, M., 1996. Functional organization of olfactory system. *J. Neurobiol.* 30, 123–176. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199605\)30:1<123::AID-NEU11>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:1<123::AID-NEU11>3.0.CO;2-N)

152. Skaggs, W.E., McNaughton, B.L., Wilson, M.A., Barnes, C.A., 1996. Theta phase precession in hippocampal neuronal populations and the compression of temporal sequences. *Hippocampus* 6, 149–172. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1996\)6:2<149::AID-HIPO6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:2<149::AID-HIPO6>3.0.CO;2-K)

153. Skrajny, B., Reiffenstein, R.J., Sainsbury, R.S., Roth, S.H., 1996. Effects of repeated exposures of hydrogen sulphide on rat hippocampal EEG. *Toxicol. Lett.* 84, 43–53. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(96\)81525-6](https://doi.org/10.1016/0378-4274(96)81525-6)

154. Slotkin, T.A., Seidler, F.J., 1988. Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn: Secretory mechanisms and their role in stress and survival. *J. Dev. Physiol.*

155. Song, H.-G., Young Kwon, J., Soo Han, H., Bae, Y.-C., Moon, C., 2008. First Contact to Odors: Our Current Knowledge about Odorant Receptor. *Sensors (Basel)*. 8, 6303–6320. <https://doi.org/10.3390/s8106303>

156. Souvannakitti, D., Kumar, G.K., Fox, A., Prabhakar, N.R., 2009. Neonatal intermittent hypoxia leads to long-lasting facilitation of acute hypoxia-evoked catecholamine secretion from rat chromaffin cells. *J. Neurophysiol.* 101, 2837–2846. <https://doi.org/10.1152/jn.00036.2009>

157. Stipanuk, M.H., Beck, P.W., 1982. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem. J.* 206, 267–77.

158. Su, C.-Y., Menuz, K., Carlson, J.R., 2009. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. *Cell* 139, 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.015>

159. Sugai, T., Miyazawa, T., Yoshimura, H., Onoda, N., 2005a. Developmental changes in oscillatory and slow responses of the rat accessory olfactory bulb. *Neuroscience* 134, 605–616.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.010>

160. Sugai, T., Onoda, N., 2005b. Effects of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antagonists on oscillatory signal propagation in the guinea-pig accessory olfactory bulb slice: Characterization by optical, field potential and patch clamp recordings. *Neuroscience* 135, 583–594.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.022>

161. Summers, B.A., Overholt, J.L., Prabhakar, N.R., 2000. Augmentation of L-type calcium current by hypoxia in rabbit carotid body glomus cells: Evidence for a PKC-sensitive pathway. *J. Neurophysiol.* 84, 1636–1644.

<https://doi.org/10.1152/jn.2000.84.3.1636>

162. Szabo, C., 2018. A timeline of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem. Pharmacol.* 149, 5–19.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.010>

163. Szabó, C., 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 917–35. <https://doi.org/10.1038/nrd2425>

164. Szabo, C., Papapetropoulos, A., 2017. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H<sub>2</sub>S Levels: H<sub>2</sub>S Donors and H<sub>2</sub>S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 69, 497–564.

<https://doi.org/10.1124/pr.117.014050>

165. Tan, B.H., Wong, P.T.H., Bian, J.S., 2010. Hydrogen sulfide: A novel signaling molecule in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 56, 3–10.

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.08.008>

166. Tancredi, V., Hwa, G.G., Zona, C., Brancati, A., Avoli, M., 1990. Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features. *Brain Res.* 511, 280–90. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90173-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90173-9)

167. Tank, D.W., Gelperin, A., Kleinfeld, D., 1994. Odors, Oscillations, and Waves: Does It All Compute? *Science* (80-. ). 265, 1819–1820.

<https://doi.org/10.1126/science.265.5180.1819>

168. Tay, A.S., Hu, L.F., Lu, M., Wong, P.T.H., Bian, J.S., 2010. Hydrogen sulfide protects neurons against hypoxic injury via stimulation of ATP-sensitive

potassium channel/protein kinase C/extracellular signal-regulated kinase/heat shock protein90 pathway. *Neuroscience* 167, 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.006>

169. Ungerer, P., Wender, A., Demoulin, G., Bourasseau, É., Mougín, P., 2004. Application of Gibbs ensemble and NPT Monte Carlo simulation to the development of improved processes for H<sub>2</sub>S-rich gases. *Mol. Simul.* 30, 631–648. <https://doi.org/10.1080/08927020410001709299>

170. Untereiner, A.A., Wu, L., Wang, R., 2012. The Role of Carbon Monoxide as a Gasotransmitter in Cardiovascular and Metabolic Regulation BT - Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology, in: Hermann, A., Sitdikova, G.F., Weiger, T.M. (Eds.), . Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 37–70. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30338-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30338-8_2)

171. Vargas-Barroso, V., Ordaz-Sánchez, B., Peña-Ortega, F., Larriva-Sahd, J.A., 2015. Electrophysiological Evidence for a Direct Link between the Main and Accessory Olfactory Bulbs in the Adult Rat. *Front. Neurosci.* 9, 518. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00518>

172. Wang, M., Zhu, J., Pan, Y., Dong, J., Zhang, Lili, Zhang, X., Zhang, Li, 2015. Hydrogen sulfide functions as a neuromodulator to regulate striatal neurotransmission in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* 93, 487–494. <https://doi.org/10.1002/jnr.23504>

173. Wang, R., 2012a. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* 92, 791–896. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2011>

174. Wang, R., 2012b. Physiological implications of hydrogen sulfide: A whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* 92, 791–896. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2011>

175. Ward, J.P.T., 2008. Oxygen sensors in context. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.10.010>

176. Weiss, J., Pyrski, M., Weissgerber, P., Zufall, F., 2014. Altered synaptic transmission at olfactory and vomeronasal nerve terminals in mice lacking N-type calcium channel Cav2.2. *Eur. J. Neurosci.* 40, 3422–3435.

<https://doi.org/10.1111/ejn.12713>

177. Whittington, M.A., Traub, R.D., Kopell, N., Ermentrout, B., Buhl, E.H., 2000. Inhibition-based rhythms: Experimental and mathematical observations on network dynamics, in: *International Journal of Psychophysiology*. pp. 315–336. [https://doi.org/10.1016/S0167-8760\(00\)00173-2](https://doi.org/10.1016/S0167-8760(00)00173-2)

178. Wong, A.Y.C., Borduas, J.-F., Clarke, S., Lee, K.F.H., Béïque, J.-C., Bergeron, R., 2013. Calcium influx through N-type channels and activation of SK and TRP-like channels regulates tonic firing of neurons in rat paraventricular thalamus. *J. Neurophysiol.* 110, 2450–64. <https://doi.org/10.1152/jn.00363.2013>

179. Wu, B., Teng, H., Zhang, L., Li, H., Li, J., Wang, L., Li, H., 2015. Interaction of Hydrogen Sulfide with Oxygen Sensing under Hypoxia. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/758678>

180. Yamamoto, N., López-Bendito, G., 2012. Shaping brain connections through spontaneous neural activity. *Eur. J. Neurosci.* 35, 1595–604. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08101.x>

181. Yuan, G., Peng, Y.J., Khan, S.A., Nanduri, J., Singh, A., Vasavda, C., Semenza, G.L., Kumar, G.K., Snyder, S.H., Prabhakar, N.R., 2016. H<sub>2</sub>S production by reactive oxygen species in the carotid body triggers hypertension in a rodent model of sleep apnea. *Sci. Signal.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf3204>

182. Yuan, Q., Knöpfel, T., 2006. Olfactory nerve stimulation-evoked mGluR1 slow potentials, oscillations, and calcium signaling in mouse olfactory bulb mitral cells. *J. Neurophysiol.* 95, 3097–3104. <https://doi.org/10.1152/jn.00001.2006>

183. Zanardo, R.C.O., Brancaleone, V., Distrutti, E., Fiorucci, S., Cirino, G., Wallace, J.L., Zanardo, R.C.O., Brancaleone, V., Distrutti, E., Fiorucci, S., Cirino, G., Wallace, J.L., 2006. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J.* 20, 2118–2120. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6270fje>

184. Zhao, W., 2001. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* 20, 6008–6016. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>

185. Zhou, Z., Xiong, W., Masurkar, A. V., Chen, W.R., Shepherd, G.M., 2006. Dendritic calcium plateau potentials modulate input-output properties of juxtglomerular cells in the rat olfactory bulb. *J. Neurophysiol.* 96, 2354–2363. <https://doi.org/10.1152/jn.00003.2006>

186. Zylbertal, A., Kahan, A., Ben-Shaul, Y., Yarom, Y., Wagner, S., 2015. Prolonged Intracellular Na<sup>+</sup> Dynamics Govern Electrical Activity in Accessory Olfactory Bulb Mitral Cells. *PLoS Biol.* 13, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002319>