



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

Departamento de Farmacobiología

**“EFECTOS DEL SULFURO DE HIDRÓGENO SOBRE LA MODULACIÓN
PRE-UNIONAL DEL TONO SIMPÁTICO Y NO ADRENÉRGICO NO
COLINÉRGICO”**

Tesis que presenta

Q.F.B. Saúl Huerta de la Cruz

Para obtener el grado de

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

Director de la Tesis: **Dr. David Centurión Pacheco**

Ciudad de México

Agosto, 2018



El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. David Centurión Pacheco, en el laboratorio 6 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 615619.

“Behind every success there is effort. Behind the effort there is passion. And behind the passion there are people with the courage to try”

-Arthur McDonald

A MIS PADRES

Carmen de la Cruz Jáuregui y Luis Huerta Quintero

Por apoyarme en cada decisión que he tomado, por aconsejarme, cuidarme y siempre preocuparse por mí. Las palabras nunca serán suficientes para agradecerles.

A MI HERMANA

Silvia Huerta de la Cruz

Por siempre ser comprensiva conmigo y hacerme reír, no te imaginas lo mucho que te amo. Eres uno de los principales motores de mi vida.

A MIS TÍAS

En especial a mi tía Oti y Silvia, por siempre apoyarme, guiarme y estar para mí. Nunca tendré manera de agradecerles lo que han hecho por mí.

A MIS PRIMOS

En especial a Leo y Ali que sin darse cuenta siempre sacan lo mejor de mí y aún sin saberlo me dan fuerzas para seguir adelante.

¡Los amo infinitamente!

I have no special talents. I am passionately curious.

-Albert Einstein

¡G R A C I A S!

AL CINVESTAV Y CONACYT

Por apoyarme durante la realización de esta maestría.

AL DR. DAVID CENTURIÓN PACHECO

Por siempre confiar en mí y por todas las cosas que he aprendido en todo este tiempo. Por las lecciones tanto académicas como de vida. Gran parte de la persona que soy ahora es gracias a usted.

A MI COMITÉ SINODAL

Dra. Luisa L. Rocha Arrieta y Dr. José Antonio Arias Montaña.

Por su tiempo y las aportaciones y sugerencias para mejorar el presente proyecto de maestría.

A ERICK J. RODRÍGUEZ PALMA

Por aguantarme todo este tiempo y apoyarme en cada paso. Por siempre estar para mí cuando te necesito y hacer que la distancia de casa pese menos. Sabes que eres pieza fundamental en mi vida y no pude escoger a nadie mejor para compartir aventuras.

A MIS AMIGOS DE VIDA

En especial a Grecia Medina, Cindy Santiago, Hernán Beltrán, Adriana Álvarez, Carolina Gómez, Geovanna Quiñonez. Mis *roomies* Erick Rodríguez, Erika Gutiérrez, Lupita García, Lau Monterrosas y Brian. Por estar en cada momento de mi vida y por todo el apoyo que siempre me brindan. Nunca podré agradecerles por todo.

A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO 6

Grecia y Adrián, por ayudarme siempre a dar formato a todo y mejorarlo (incluida mi vida). Dra. Araceli, por todo su apoyo y sus consejos tanto académicos como de vida.

Caro, por siempre aguantarme (sé que no es fácil) y por nuestros viajes llenos de diversión, risas y alegrías. Hernán, por siempre hacerme reír aún en mis peores días. Diana y Paco, por siempre apoyarme. Ashline, Fabiola, Andrea y todos, por hacer que el trabajo nunca parezca trabajo. Por ser los mejores *labmates* del mundo.

A LA GENERACIÓN DE MAESTRÍA 2016-2018

En especial a Erick, Cindy, Caro, Adri, Marysol, Andrea, David, Viri y Erika C. por los excelentes momentos que pasamos juntos y por hacer increíbles este tiempo.

A LA GENERACIÓN DE MAESTRÍA 2017-2019

En especial a Hernán, Christopher, Daniel, Diana, Eduardo, Frida, Iker, Alejandro, Iliana, Iván y Hermann por llegar a mi vida y brindarme los mejores momentos de toda la maestría.

A MIS AMIGOS DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

Por siempre apoyarme en cada paso y estar cada día dándome su mejor sonrisa.

AL PERSONAL DE LA UNIDAD COAPA DEL CINVESTAV

En especial a la M.B.E.I. María del Pilar Quintero Carillo por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico. Al Sr. Ramón Martínez y personal de bioterio por ser parte fundamental en la realización de este proyecto. Por todo el apoyo brindado durante este tiempo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El sistema cardiovascular	1
1.1.1. El Corazón.....	2
1.1.2. Los vasos sanguíneos.....	4
1.1.2.1. Estructura de los vasos sanguíneos.....	6
1.1.2.2. Regulación de la presión arterial.....	6
1.2. El sistema nervioso.....	8
1.2.1. El sistema nervioso autónomo.....	9
1.2.1.1. Sistema nervioso parasimpático.....	9
1.2.1.2. Sistema nervioso simpático.....	11
1.3 Transmisión no adrenérgica/no colinérgica	13
1.3.1. Péptido relacionado al gen de la calcitonina.....	14
1.4 Neurotransmisión en la unión neuroefectora	16
1.5 Neurotransmisión mediada por gases	19
1.5.1 Óxido nítrico	19
1.5.2 Sulfuro de hidrógeno	20
2. ANTECEDENTES	21
2.1 Sulfuro de Hidrógeno	21
2.1.1 Historia del sulfuro de hidrógeno	23
2.1.2 Biosíntesis del sulfuro de hidrógeno.....	25

2.1.3	Sulfhidración de proteínas	27
2.1.4	Metabolismo del sulfuro de hidrógeno	28
2.1.5	Sulfuro de hidrógeno en el sistema cardiovascular	29
2.2	Modelo de la rata descerebrada y desmedulada	31
3.	JUSTIFICACIÓN	33
4.	HIPÓTESIS	34
5.	OBJETIVOS	35
5.1	Objetivo general	35
5.2	Objetivos particulares	35
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1	Animales	36
6.2	Rata descerebrada y desmedulada	36
6.3	Estimulación selectiva del tono simpático vasopresor y cardioacelerador	37
6.4	Estimulación del tono vasodepresor NANC	37
6.5	Protocolo experimental	37
6.5.1	Determinación del efecto del NaHS sobre el tono simpático vasopresor	39
6.5.2	Determinación del efecto del NaHS sobre el tono simpático cardioacelerador	40
6.5.3	Determinación del efecto del NaHS sobre el tono no adrenérgico/no colinérgico	41
6.6	Análisis estadístico	41
6.6.1	Efecto sobre el tono simpático vasopresor y cardioacelerador	41
6.6.2	Efecto sobre el tono sensorial no adrenérgico/no colinérgico	42
7.	RESULTADOS	43
7.1	Efecto del NaHS sobre el tono vasopresor	43

7.1.1	Efecto del NaHS sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación selectiva del tono simpático vasopresor	43
7.1.2	Efecto del NaHS sobre las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina y metoxamina.	45
7.2	Efecto del NaHS sobre el tono simpático cardioacelerador	47
7.2.1	Efecto del NaHS sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación selectiva del tono simpático vasopresor	47
7.2.2	Efecto del NaHS sobre las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina e isoproterenol	48
7.3	Efecto del NaHS sobre el tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico.....	51
7.3.1	Efecto del NaHS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación selectiva del tono sensorial no adrenérgico no colinérgico	51
7.3.2	Efecto del NaHS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por α -CGRP.....	53
8.	DISCUSIÓN	55
8.1	Efecto del NaHS sobre el tono simpático vasopresor	55
8.2	Efecto del NaHS sobre el tono simpático cardioacelerador	58
8.3	Efecto del NaHS sobre el tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico.....	60
8.4	Relación del H ₂ S con la hipertensión.....	63
9.	CONCLUSIONES	66
10.	PERSPECTIVAS.....	67
11.	REFERENCIAS.....	68
12.	ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Circulación pulmonar y sistémica	3
Fig. 2. Tipos de vasos sanguíneos encontrados en la circulación.....	4
Fig. 3. Clasificación del sistema nervioso	9
Fig. 4. Características del sistema nervioso parasimpático	10
Fig. 5. Características del sistema nervioso simpático	11
Fig. 6. Receptores adrenérgicos y muscarínicos y sus efectos en el corazón y los vasos sanguíneos	13
Fig. 7. Vías de señalización del CGRP.....	16
Fig. 8. Síntesis y degradación de A) neurotransmisores clásicos y B) neuropéptidos.....	18
Fig. 9. Biosíntesis de sulfuro de hidrógeno.....	26
Fig. 10. Mecanismos de sulfhidración de proteínas.....	27
Fig. 11. Metabolismo del sulfuro de hidrógeno	28
Fig. 12. Posible interacción del H ₂ S con el sistema nervioso simpático y no adrenérgico/no colinérgico.....	33
Fig. 13. Protocolo experimental.....	38
Fig. 14. Registros originales que muestran las respuestas inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático vasopresor a las frecuencias de 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 Hz en presencia de infusión continua de: (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) 310 µg/kg min NaHS; y (C) 560 µg/kg min NaHS ...	43
Fig. 15. Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 310 µg/kg min; o (C) NaHS 560 µg/kg min sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático vasopresor (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 Hz)	44
Fig. 16. Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 310 µg/kg min; o (C) NaHS 560 µg/kg min sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático vasopresor (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 µg/kg)	46

Fig. 17. Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 310 µg/kg min; o (C) NaHS 560 µg/kg min sobre las respuestas vasopresoras inducidas por administración de metoxamina (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 µg/kg)	46
Fig. 18. Área bajo la curva del efecto de NaHS, o su vehículo, sobre las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina.....	47
Fig. 19. Registros originales que muestran las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático cardioacelerador a las frecuencias de 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 3.2 Hz antes (primera curva estímulo-respuesta) y durante (segunda curva estímulo-respuesta) la infusión continua de: (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) 310 µg/kg min de NaHS; y (C) 560 µg/kg min de NaHS.....	49
Fig. 20. Efecto de (A) nada (control de reproducibilidad); (B) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (C) NaHS 310 µg/kg min; o (D) NaHS 560 µg/kg min sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático cardioacelerador (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 Hz).....	50
Fig. 21. Efecto de (A) nada (control de reproducibilidad); (B) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (C) NaHS 310 µg/kg min; o (D) NaHS 560 µg/kg min sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por la administración de noradrenalina (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 µg/kg)	50
Fig. 22. Efecto de (A) nada (control de reproducibilidad); (B) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (C) NaHS 310 µg/kg min; o (D) NaHS 560 µg/kg min sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por la administración de isoproterenol (0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03 y 0.1 µg/kg)	51
Fig. 23. Registros originales que muestran las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial no adrenérgico/no colinérgico a las frecuencias de 0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz durante la infusión continua de: (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) 10 µg/kg min de NaHS; y (C) 18 µg/kg min de NaHS.....	52
Fig. 24. Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 10 µg/kg min; o (C) NaHS 18 µg/kg min sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por	

estimulación del tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico
(0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz) 53

Fig. 25. Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 10 µg/kg min; o
(C) NaHS 18 µg/kg min sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por
administración exógena de α-CGRP (0.31, 0.56. 1.0, 1.8 y 3.1 µg/kg) 54

Fig. 26. Interacción del H₂S con el sistema nervioso simpático y no
adrenérgico/no colinérgico..... 66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño y función de los diferentes vasos sanguíneos en la circulación sistémica 5

ABREVIATURAS

3-MST	3 mercaptopiruvato sulfur-transferasa
ABC	Área bajo la curva
AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
Akt	Cinasa B de proteínas
AMP	Adenosín monofosfato
AMP _c	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
AV	Auriculo-ventricular
BIBN 4096	Olcegepant
BK _{Ca²⁺}	Canales de K ⁺ dependientes de calcio de gran conductancia
C ₇	Vértebra cervical 7
Ca ²⁺	Calcio
CAT	Cistationin-amino-transferasa
CBS	Cistationin-β-sintasa
CGRP	Péptido relacionado al gen de la calcitonina
CGRP ₈₋₃₇	Fragmento 8-37 del péptido relacionado al gen la calcitonina
cm	Centímetros
CML	Célula del músculo liso
CMLV	Célula del músculo liso vascular
CO	Monóxido de carbono
CSE	Cistationin-γ-liasa
Cys-SOH	Ácido sulfónico de cisteína
DA	Dopamina
DADS	Dialildisulfuros
DAG	Diacilglicerol
DATS	Dialiltrisulfuros
e.e.m.	Error estándar de la media
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial

Fig	Figura
GC	Guanilato ciclasa
GMP _c	Guanosin monofosfato cíclico
GY4137	Ácido (p-metoxifenil)morfolino-fosfinoditioico
h	Horas
Hz	Hertz
H ₂ S	Sulfuro de hidrogeno
H ₂ S ₂	Disulfuro de hidrogeno
HC030031	1,2,3,6-Tetrahydro-1,3-dimethyl-N-[4-(1-methylethyl) phenyl]- 2,6-dioxo-7H-purine-7-acetamide
HNO	Anión nitroxilo
HR	Humedad relativa
i.v.	Intravenosa
IP ₃	Inositol trifosfato
K ⁺	Potasio
K _{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP
kg	Kilogramo
KO	Knock Out
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginina Metil Ester
L-NMMA	L-N ^G -monometil Arginina Acetato
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minuto
ml	Mililitro
MLV	Musculo liso vascular
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mm Hg	Milímetros de mercurio
ms	Milisegundos
NA	Noradrenalina
Na ₂ S	Sulfuro de sodio

NaHS	Sulfhidrato de sodio
NANC	No adrenérgico/no colinérgico
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa 1
PBS	Solución amortiguadora con fosfatos
PDE5	Fosfodiesterasa 5
PIP ₂	4-5, bifosfato de fosfatidilinositol
PLC	Fosfolipasa C
PPG	Propagilglicina
ppm	Partes por millón
RS	Retículo sarcoplásmico
SA	Sinoauricular
Ser	Serina
SERCA	Bomba Ca ²⁺ /ATPasa del retículo sarcoplásmico
SN	Sistema nervioso
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SP	Sustancia P
T ₁	Vertebra torácica 1
T ₁₂	Vertebra torácica 12
T ₇	Vertebra torácica 7
T ₉	Vertebra torácica 9
TRPA1	Receptor de potencial transitorio ankirina 1
TRPV1	Receptor de potencial transitorio vaniloide 1
V	Volts
μg	Microgramos
μm	Micrómetros
μM	Micromolar

RESUMEN

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un gasotransmisor con importantes efectos cardiovasculares. El presente estudio fue diseñado para evaluar la capacidad del NaHS para inhibir el tono simpático y de incrementar la liberación de CGRP de los nervios sensoriales. Para tal propósito, ratas Wistar macho fueron anestesiadas, descerebradas y desmeduladas y canuladas. Los animales se dividieron en 3 grupos. El primer grupo se dividió en: 1) estimulación del tono simpático vasopresor (T_7 - T_9); 2) bolos i.v. de noradrenalina; y 3) bolos i.v. de metoxamina. Posteriormente, cada subgrupo recibió una infusión continua de: 1) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); 2) NaHS 310 μ g/kg min; o 3) NaHS 560 μ g/kg min. El segundo grupo se dividió en 3 subgrupos: 1) estimulación del tono simpático cardioacelerador (C_7 - T_1); 2) bolos i.v. de noradrenalina; y 3) bolos i.v. de isoproterenol. Cada subgrupo recibió una infusión continua de: 1) control de reproducibilidad (sin infusión); 2) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); 3) NaHS 310 μ g/kg min; o 4) NaHS 560 μ g/kg min. El tercer grupo se dividió en respuestas vasodepresoras inducidas por: 1) estimulación no adrenérgica/no colinérgica (T_9 - T_{12}); y 2) bolos i.v. de α -CGRP. A su vez, ambos grupos se subdividieron en: 1) grupo control (sin infusión); 2) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); 3) NaHS 10 μ g/kg min; y 4) NaHS 18 μ g/kg min. Las respuestas vasopresoras y taquicárdicas inducidas por estimulación selectiva del tono simpático vasopresor y cardioacelerador fueron disminuidas significativamente y de manera dosis-dependiente por la infusión continua de NaHS. Por otra parte, el NaHS incrementó significativamente las respuestas vasodepresoras inducidas por la estimulación eléctrica del tono NANC. Sin embargo, el NaHS no tuvo efecto significativo sobre: (1) las respuestas vasodepresoras inducidas por noradrenalina o metoxamina; (2) las respuestas taquicárdicas inducidas por noradrenalina o isoproterenol; y (3) las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos i.v. de α -CGRP. Estos resultados permiten sugerir que el NaHS es capaz de inhibir el tono simpático vasopresor y cardioacelerador, así como incrementar el tono sensorial vasodepresor por un mecanismo pre-unional, sin interactuar directamente con receptores post-unionales.

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H₂S) is a gasotransmitter with important cardiovascular effects. In this respect, the present study was designed to evaluate the capability of an H₂S donor, NaHS, to inhibit the sympathetic outflow supplying the heart and blood vessels and to increase CGRP release from NANC sensory nerves. For that purpose, male Wistar rats were anesthetized, pithed and the carotid and femoral veins were cannulated. Animals were initially divided into 3 main sets. The first set was subdivided into 3 groups: 1) vasopressor sympathetic outflow stimulation (T₇-T₉); 2) i.v. bolus of exogenous noradrenaline; and 3) i.v. bolus of methoxamine. Then, each subgroup received a continuous infusion of: 1) PBS (vehicle); 2) NaHS 310 µg/kg min; or 3) NaHS 560 µg/kg min. The second set was subdivided into 4 subgroups: 1) cardioaccelerator sympathetic outflow stimulation (C₇-T₁); 2) i.v. bolus of exogenous noradrenaline; and 3) i.v. bolus of isoproterenol. Those groups were then divided into 4 subgroups: 1) reproducibility group (without infusion); continuous infusion of: 2) PBS (vehicle); 3) NaHS 310 µg/kg min; and 4) NaHS 560 µg/kg min, respectively. The last set was divided into vasodepressor responses induced by: 1) sensory outflow stimulation (T₉-T₁₂) and 2) i.v. bolus of α-CGRP which were subdivided into 4 groups: 1) control group (without infusion); continuous infusion of: 2) PBS (vehicle); 3) NaHS 10 µg/kg min; and 4) NaHS 18 µg/kg min. The vasopressor and tachycardic responses induced by stimulation of the vasopressor and cardioaccelerator sympathetic outflow stimulation were significantly diminished by a continuous infusion of NaHS. On the other hand, NaHS increased the vasodepressor responses induced by electrical stimulation. However, NaHS did not significantly modify the vasopressor responses induced by i.v. bolus of noradrenaline or methoxamine. Moreover, NaHS failed to modify the tachycardic responses induced by i.v. bolus of neither noradrenaline nor isoproterenol. Furthermore, NaHS did not change the vasodepressor responses induced by α-CGRP. These results suggest that NaHS is capable to prejunctionally inhibit the vasopressor and the tachycardic outflow, as well as increased vasodepressor sensory outflow.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular tiene la función de transportar los nutrientes hacia los tejidos. Se encarga de la recolección de los productos de desecho para su posterior eliminación. En organismos más pequeños, no existe este sistema porque pueden cubrir sus necesidades por simple difusión. Sin embargo, el cuerpo humano es demasiado grande para que la simple difusión sea eficaz. La evolución del sistema cardiovascular ha proporcionado un medio de facilitar los procesos de difusión, permitiendo el desarrollo de organismos mayores (Evans, 2013).

Las funciones del sistema circulatorio pueden dividirse en tres áreas amplias: transporte, regulación y protección (Fox, 2013):

1. Transporte. El sistema circulatorio transporta todas las sustancias esenciales para el metabolismo celular.
 - 1.1. Respiratorias: Los eritrocitos transportan oxígeno hacia las células.
 - 1.2. Nutritivas: la sangre transporta los productos de la digestión hacia las células del cuerpo.
 - 1.3. Excretoras: los desechos metabólicos, el agua y los iones excesivos son transportados hacia los riñones y excretados por la orina.
2. Regulación. El sistema circulatorio contribuye a la regulación tanto hormonal como de la temperatura.
 - 2.1. Hormonal: la sangre transporta hormonas desde su sitio de origen hacia los tejidos blandos distantes, donde desempeñan diversas funciones reguladoras.
 - 2.2. Temperatura: el control de la temperatura por la desviación de la sangre desde vasos cutáneos más profundos hacia vasos más superficiales, o viceversa.

3. Protección. El sistema circulatorio protege contra pérdida de sangre por lesión y contra agentes patógenos.

3.1. Coagulación: el mecanismo de coagulación protege contra pérdida de sangre cuando hay daño de los vasos.

3.2. Función inmunitaria: transportando células inmunitarias, antígenos y otros mediadores.

El sistema cardiovascular tiene dos componentes principales: el corazón y los vasos sanguíneos. El sistema linfático también forma parte del sistema cardiovascular y aunque no transporta sangre cumple con una función de transporte e intercambio muy importante (Klabunde, 2012).

1.1.1. El Corazón

El corazón puede ser descrito como una bomba que eyecta sangre tanto a la circulación pulmonar como a la sistémica. La circulación pulmonar se refiere al flujo sanguíneo hacia los pulmones que está involucrada con el intercambio gaseoso. La circulación sistémica comprende los vasos sanguíneos dentro y fuera de todos los órganos excluyendo a los pulmones (Broadley, 1996a).

De manera general, el lado derecho del corazón comprende la aurícula y el ventrículo derecho. La aurícula derecha recibe la sangre venosa de la circulación sistémica. El ventrículo derecho bombea dicha sangre hacia la circulación pulmonar para que se lleve a cabo el intercambio entre dióxido de carbono y oxígeno entre la sangre y los alveolos. Por otra parte, el lado izquierdo consta de la aurícula y el ventrículo izquierdo. La sangre que sale de los pulmones llega a la aurícula izquierda a través de la vena pulmonar. La sangre fluye hacia el ventrículo izquierdo de donde es eyectada hacia la aorta, la cual distribuye la sangre hacia todos los órganos por medio de las arterias (Fig. 1) (Evans, 2013; Klabunde, 2012).

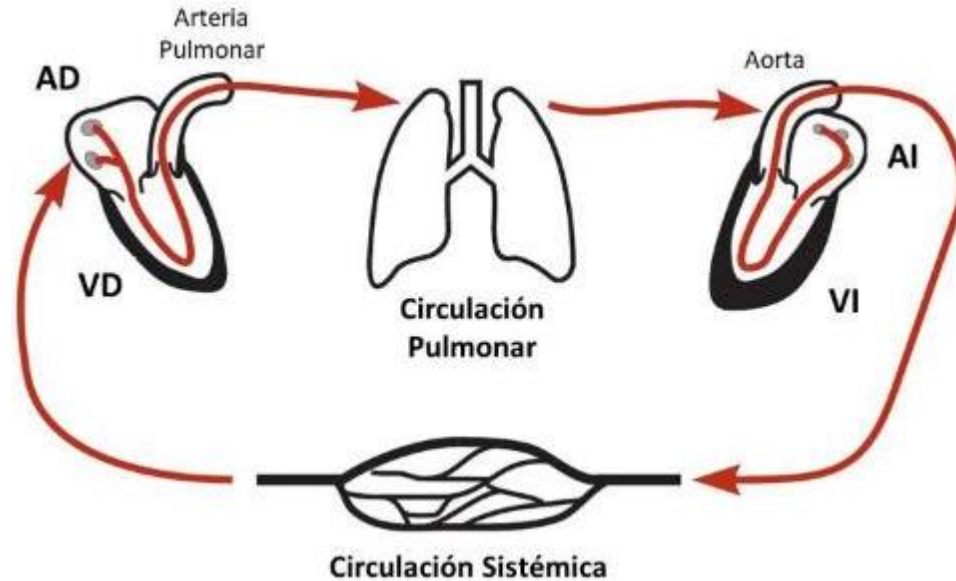


Fig. 1. Circulación pulmonar y sistémica. En la circulación pulmonar la aurícula derecha recibe la sangre venosa de la circulación sistémica. El ventrículo derecho bombea dicha hacia los pulmones. En la circulación sistémica, la sangre proveniente de los pulmones llega a la aurícula izquierda. La sangre fluye hacia el ventrículo izquierdo de donde es eyectada hacia la aorta distribuyéndola a todos los órganos. AD, Aurícula Derecha; VD, Ventrículo Derecho; AI, Aurícula Izquierda; VI, Ventrículo Izquierdo. Modificado de Klabunde, 2005

La función del corazón se expresa usualmente como gasto cardíaco. El gasto cardíaco se refiere a la cantidad de sangre eyectada por cada contracción multiplicada por la frecuencia cardíaca. Por tanto, es la cantidad de trabajo realizada por el corazón en respuesta a los requerimientos de oxígeno. Dos formas de regular la cantidad de oxígeno es modulando la frecuencia cardíaca y el volumen sistólico (King y Bhimji, 2018). Cualquier factor que altere la frecuencia cardíaca o el volumen sistólico resultará en una modificación del gasto cardíaco.

La frecuencia cardíaca está determinada por las células marcapasos. La actividad de dichas células se puede aumentar o disminuir por influencia de las terminaciones autonómicas o ciertas hormonas. Los potenciales de acción generados por las células marcapasos son conducidos a través del corazón por un sistema de fibras especializadas y desencadenan la contracción de los

miocitos cardíacos. Lo anterior resulta en la contracción ventricular y en la consecuente eyección de la sangre. La fuerza de contracción, y por tanto el volumen sistólico, están regulados por mecanismos intrínsecos del corazón así como por factores hormonales y la inervación autonómica (Klabunde, 2012).

1.1.2. Los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos son conductos distensibles, ramificados, cuyas dimensiones son variables y comprenden arterias, venas y capilares (Fig. 2). El sistema vascular desempeña dos funciones principales: distribución e intercambio (Klabunde, 2012).

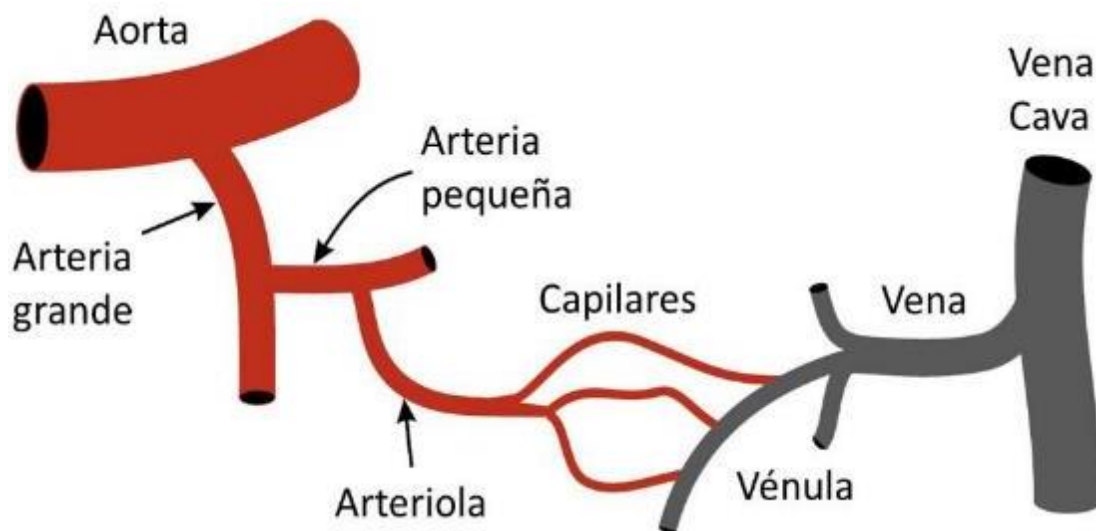


Fig. 2. Tipos de vasos sanguíneos encontrados en la circulación. La aorta se va ramificando en arterias grandes, arterias pequeñas y arteriolas. Conforme van perdiendo el músculo liso vascular se forman los capilares. Los capilares dan origen a las vénulas, conforme aumenta el grosor se da origen a las venas y finalmente la vena cava. Modificado de Klabunde, 2005

La aorta es el principal vaso sanguíneo que distribuye la sangre desde el corazón hacia el sistema circulatorio. La aorta se ramifica en arterias grandes (carótida, mesentérica y renal) para distribuir el flujo sanguíneo hacia los órganos o regiones específicas del cuerpo. A pesar de que estas arterias grandes tienen la capacidad de relajarse o contraerse, no contribuyen de

manera significativa a la regulación de la presión arterial o el flujo sanguíneo bajo condiciones fisiológicas. Una vez que estas arterias han alcanzado el órgano al cual irrigarán de sangre, se ramifican en arterias más pequeñas que distribuyen la sangre dentro del órgano. Dichas arterias pequeñas se van ramificando en vasos cada vez más pequeños; una vez que alcanzan diámetros menores a 200 μm son denominadas arteriolas. Las arterias pequeñas y las arteriolas son consideradas los principales vasos sanguíneos de resistencia, y por tanto, son los encargados de regular la presión arterial y el flujo sanguíneo dentro de los órganos (Klabunde, 2012).

A medida que las arteriolas se vuelven más pequeñas en su diámetro ($<10 \mu\text{m}$), pierden su capa de músculo liso. Los vasos que están compuestos únicamente de capa endotelial son denominados capilares y son el principal sitio de intercambio de nutrientes y desechos metabólicos (Evans, 2013; Klabunde, 2012).

En la Tabla 1, se resumen los tipos de vasos sanguíneos, así como sus diámetros y funciones dentro de la circulación sistémica.

Tabla 1. Tamaño y función de los diferentes vasos sanguíneos en la circulación sistémica. Modificada de Klabunde, 2005.

Tipo de vaso	Diámetro (mm)	Función
Aorta	25	Amortiguación de pulso y distribución
Arterias grandes	1.0-4.0	Distribución
Arterias pequeñas	0.2-1.0	Distribución y resistencia
Arteriolas	0.01-0.02	Resistencia (regulación de la presión y flujo)
Capilares	0.006-0.010	Intercambio
Vénulas	0.01-0.02	Intercambio, recolección y capacitancia
Venas	0.2-0.5	Capacitancia (almacén de sangre)
Vena cava	35	Recolección

1.1.2.1. *Estructura de los vasos sanguíneos*

De manera general, los vasos sanguíneos están compuestos por 3 capas: la íntima, la media y la adventicia. Cada una de las capas posee las siguientes características:

- ✓ Capa íntima
 - Está compuesta por una capa de células endoteliales que se encuentra separada de la capa media por una lámina basal. Además, esta capa se encuentra en contacto directo con la sangre (Stenmark et al., 2013).
- ✓ Capa media
 - Contiene células del músculo liso vascular que están incrustadas en una matriz de colágeno, elastina y distintas glicoproteínas. Dichas células se encuentran organizadas de modo que su contracción reduce el diámetro del vaso sanguíneo. Asimismo, la cantidad de músculo liso, colágeno y elastina determina las propiedades mecánicas de cada vaso (Stenmark et al., 2013).
- ✓ Capa adventicia
 - Se encuentra separada de la capa media por una lámina elástica externa. Esta capa contiene colágeno, fibroblastos, adipocitos, los vasos sanguíneos de los vasos grandes (*vasa vasorum*), nervios linfáticos y autonómicos; entre otros tipos celulares (Stenmark et al., 2013).

1.1.2.2. *Regulación de la presión arterial*

Los vasos sanguíneos se pueden contraer o dilatar para regular la presión arterial, alterar el flujo sanguíneo dentro de los órganos, regular la presión sanguínea en los capilares y distribuir la sangre dentro del cuerpo. Los cambios en el diámetro de los vasos sanguíneos se presentan por activación del músculo liso vascular dentro de las paredes vasculares. Dichos cambios se dan por los nervios autonómicos; señales bioquímicas y metabólicas, o

sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio vascular (Tortora y Derrickson, 2013).

Como ya se mencionó, los vasos sanguíneos de resistencia regulan la presión arterial y se encuentran altamente inervados por el sistema nervioso autónomo (en especial el simpático adrenérgico). Los vasos se contraen o dilatan en respuesta a cambios en la actividad de las terminaciones simpáticas. Además, tienen una alta expresión de receptores para hormonas circulantes (catecolaminas y angiotensina II, entre otras). Las hormonas tienen la capacidad de modificar el diámetro de los vasos de resistencia. Los vasos responden a distintas sustancias sintetizadas por el tejido que rodea el vaso sanguíneo (adenosina, entre otros); por el endotelio vascular (óxido nítrico, entre otros); o canales iónicos (Godo y Shimokawa, 2017; Klabunde, 2012; Tykocki et al., 2017).

El control de la presión arterial es de vital importancia ya que provee la fuerza motriz para la perfusión de los órganos. Los mecanismos neurohumorales que regulan la función cardiovascular se encuentran regulados por sensores de presión localizados en las arterias y venas (Evans, 2013; Klabunde, 2012; Tortora y Derrickson, 2013).

Los barorreceptores, a través de sus proyecciones aferentes hacia el cerebro, llevan la información sobre el estado de la presión sanguínea en el cuerpo directamente al sistema nervioso central. Una disminución en la presión arterial, desencadena el reflejo barorreceptor que estimula el corazón para incrementar el gasto cardíaco y contrae los vasos sanguíneos para restaurar la presión arterial. Dichos mecanismos ocurren mediante cambios en la actividad nerviosa autónoma. Particularmente, incrementando el tono simpático y disminuyendo el parasimpático (Taylor y Bisognano, 2010).

Adicionalmente, una disminución en la presión arterial estimula la liberación de hormonas que, junto con el incremento de la actividad simpática, ayudan a

restaurar la presión arterial. Las hormonas actúan en el corazón, los vasos sanguíneos o la función renal con la finalidad de incrementar el volumen sanguíneo (Klabunde, 2012; Tortora y Derrickson, 2013).

1.2. El sistema nervioso

El sistema nervioso se clasifica funcional y anatómicamente en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC comprende estructuras como el encéfalo (cerebro, cerebelo, bulbo raquídeo) y la médula espinal. Dichas estructuras funcionan como un centro de integración de la información que proviene de la periferia. Por otra parte, el SNP se clasifica en dos principales divisiones; la primera de ellas incluye la porción aferente, también denominada sensorial. El sistema sensorial está encargado de llevar la información de la periferia al SNC. El sistema sensorial se clasifica en sensorial interno y sensorial externo dependiendo del origen de los estímulos recibidos.

Asimismo, el SNP incluye una porción eferente o motora que se subdivide en somática y autónoma. El sistema nervioso somático inerva todas aquellas estructuras que pueden ser controladas de manera consciente como el músculo-esquelético. El sistema nervioso autónomo inerva estructuras sobre los cuales no tenemos una regulación consciente, y que son denominados órganos autónomos tales como el corazón, los vasos sanguíneos, glándulas, entre otros. A su vez, el sistema nervioso autónomo se clasifica en sistema nervioso simpático y parasimpático (Fig.3) (Purves, 2004).

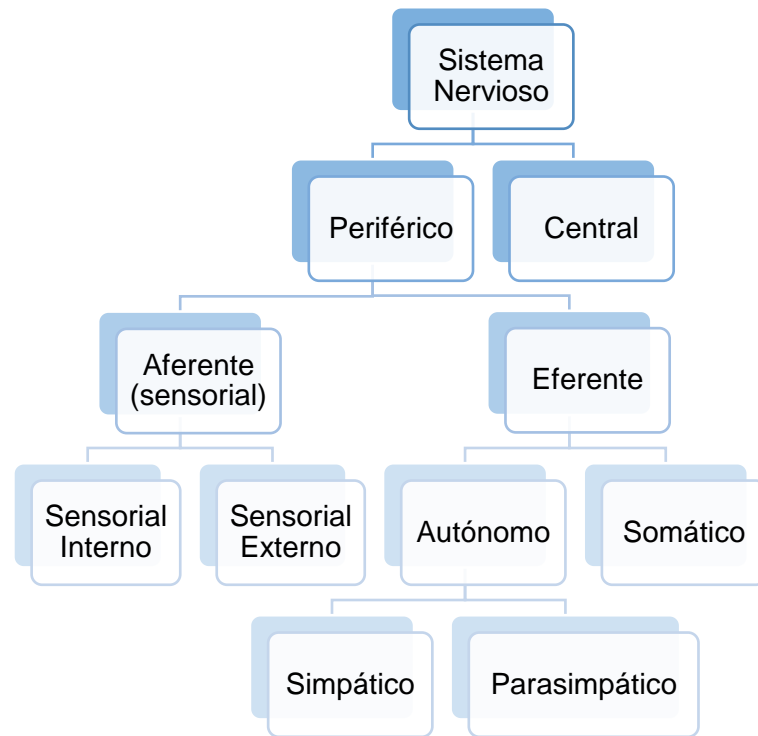


Fig. 3. Clasificación del sistema nervioso. El sistema nervioso se divide en central y periférico. El sistema nervioso periférico se subdivide en aferente y eferente. El aferente es sensorial interno o externo. El eferente se divide en somático y autónomo que comprende al simpático y parasimpático.

1.2.1. El sistema nervioso autónomo

El sistema nervioso autónomo está ampliamente distribuido en todo el cuerpo y regula las funciones autonómicas, es decir, aquellas que ocurren sin control consciente. En la periferia, el sistema nervioso autónomo, consiste de nervios, ganglios y plexos que inervan al corazón, vasos sanguíneos, glándulas, vísceras y músculo liso en varios tejidos. Se clasifica en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático (Westfall y Westfall, 2011).

1.2.1.1. Sistema nervioso parasimpático

El sistema nervioso parasimpático tiene su origen a nivel cráneo-sacral y presenta fibras pre-ganglionares largas. Las fibras post-ganglionares son cortas. La relación fibra pre-ganglionar: fibra post-ganglionar es 1:1, por lo que

produce respuestas localizadas. Además, tanto las neuronas pre-ganglionares como post-ganglionares liberan acetilcolina (ACh) como neurotransmisor. La ACh liberada se une a receptores nicotínicos a nivel pre-ganglionar y a receptores muscarínicos a nivel post-ganglionar. Los receptores muscarínicos pueden ser tipo M_1 , M_3 y M_5 , los cuales están acoplados a proteínas G_q ; o bien, M_2 y M_4 que se encuentran acoplados a proteínas $G_{i/o}$ (Fig. 4) (Katzung, 2013).

Los vasos sanguíneos de resistencia carecen de inervación parasimpática. Por otra parte, el corazón únicamente recibe inervación parasimpática en los nodos sinoauricular (SA) y auriculoventricular (AV). Dicha inervación tiene efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos que se generan al estimular los receptores muscarínicos M_2 , que son los mayormente expresados en el corazón. La unión de la ACh a los receptores M_2 induce la activación de proteínas $G_{i/o}$. Dicha unión inhibe la enzima adenilato ciclasa (AC) ocasionando una disminución en las concentraciones intracelulares de AMPc y activación directa de los canales de K^+ por las subunidades β y γ . Lo anterior produce una hiperpolarización, así como el cierre de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y en consecuencia, reduce la excitabilidad membranar (van Koppen y Kaiser, 2003).

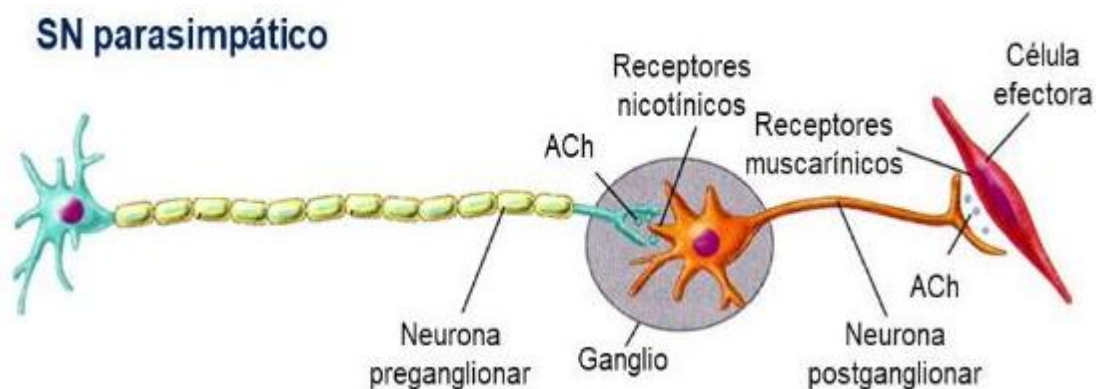


Fig. 4. Características del sistema nervioso parasimpático. La neurona preganglionar libera ACh que se une a receptores nicotínicos en la neurona postganglionar. La neurona postganglionar libera ACh que se une a receptores muscarínicos en la célula efectora. SN, Sistema Nervioso; ACh, acetilcolina.

1.2.1.2. Sistema nervioso simpático

El sistema nervioso simpático se origina a nivel toraco-lumbar. Presenta fibras pre-ganglionares cortas. Las fibras post-ganglionares son largas. La relación fibra pre-ganglionar: fibra post-ganglionar es 1:20 o más, por lo que produce respuestas generalizadas. Al igual que el sistema nervioso parasimpático, el sistema nervioso simpático libera ACh a nivel pre-ganglionar que se une a receptores nicotínicos. A nivel post-ganglionar tiene la capacidad de liberar noradrenalina (NA), ACh o dopamina (DA) en los vasos sanguíneos de resistencia, en los vasos sanguíneos que irrigan el músculo liso y en la arteria renal, respectivamente (Fig. 5) (Westfall y Westfall, 2011).

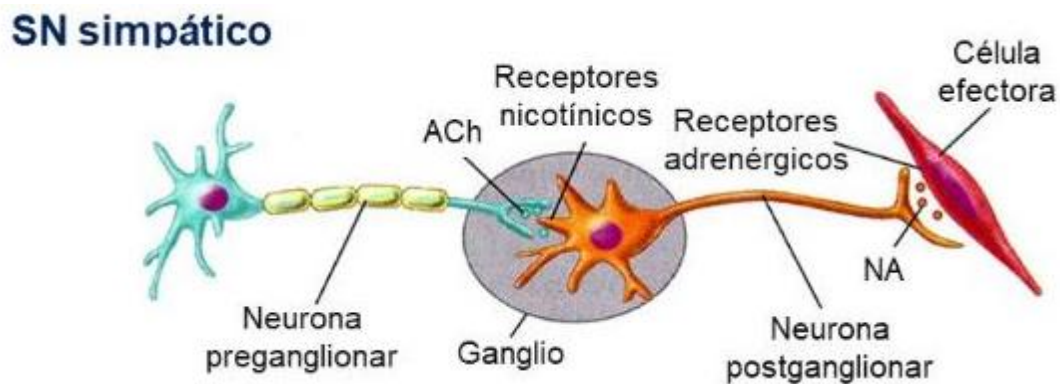


Fig. 5. Características del sistema nervioso simpático. La neurona preganglionar libera ACh que se une a receptores nicotínicos en la neurona postganglionar. La neurona postganglionar libera ACh que se une a receptores adrenérgicos en la célula efectora. SN, Sistema Nervioso; ACh, acetilcolina; NA, noradrenalina.

La NA liberada de las neuronas simpáticas actúa sobre los receptores α -adrenérgicos de los vasos sanguíneos. Dependiendo si se trata de α_1 o α_2 puede activar distintas vías de señalización que tienen como efecto final la contracción del músculo liso vascular (Fig. 6) (Aburto et al., 1993; Cotecchia, 2010).

Los receptores α_1 están acoplados a proteínas G_q . Al unirse el ligando se promueve la activación de la fosfolipasa C (PLC). Lo anterior induce un aumento de las concentraciones de diacil-glicerol (DAG) y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) por hidrólisis del 4,5-bifosfato de fosfatidil-inositol (PIP_2). El IP_3 activa a receptores ubicados en el retículo sarcoplásmico (RS). Dichos receptores son canales de Ca^{2+} dependientes de ligando por lo que inducen la salida de Ca^{2+} del RS. Por tanto, se incrementan los niveles intracelulares de dicho ion y favorece el proceso de contracción del MLV (Cotecchia, 2010).

Por otra parte, los receptores α_2 están acoplados a proteínas $G_{i/o}$. Al ser activados inhiben la enzima adenilato ciclasa (AC). La AC es una enzima que cataliza la conversión de AMP a AMPc. Por lo tanto, al inhibir dicha enzima se disminuye la concentración intracelular de AMPc promoviendo la contracción de los vasos sanguíneos (Aburto et al., 1993).

Asimismo, la NA puede interactuar con los receptores β que pueden ser tipo β_1 , β_2 o β_3 . Los 3 subtipos de receptores β -adrenérgicos están acoplados a proteínas G_s . La unión del ligando induce la activación de la AC aumentando los niveles intracelulares de AMPc. En el corazón, lo anterior se traduce en un efecto de cronotropismo e inotropismo positivo. Por tanto, se produce un aumento de la fuerza y velocidad de contracción, específicamente a través de la activación de receptores β_1 . Los receptores β_1 son los que tienen mayor expresión en dicho tejido. Por otra parte, en los vasos sanguíneos, la activación de los receptores β_2 se traduce en vasorrelajación (Fig. 6) (Madamanchi, 2007).

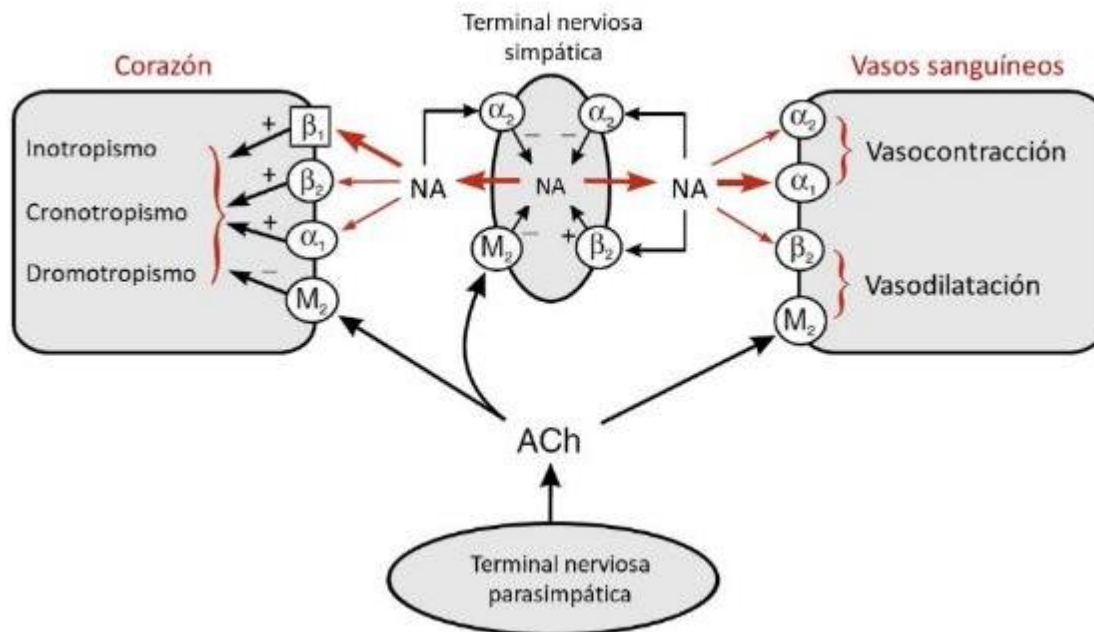


Fig. 6. Receptores adrenérgicos y muscarínicos y sus efectos en el corazón y los vasos sanguíneos. La noradrenalina (NA) liberada de las terminales simpáticas se unen a los receptores adrenérgicos en el corazón para producir inotropismo, cronotropismo y dromotropismo positivos. En los vasos sanguíneos, la NA se une a los receptores α -adrenérgicos e induce vasoconstricción, mientras que la unión a receptores β_2 -adrenérgicos causa vasodilatación. Tanto en tejido cardíaco como vascular los receptores α_2 -adrenérgicos pre-unionales inhiben la liberación de noradrenalina y los receptores β_2 -adrenérgicos pre-unionales promueven la liberación de noradrenalina. Los nervios parasimpáticos en el corazón liberan acetilcolina que se une a receptores muscarínicos pre-unionales (M_2) para inhibir la liberación de noradrenalina. La acetilcolina se une a receptores M_2 post-unionales para disminuir el inotropismo, cronotropismo y dromotropismo. En órganos específicos (por ejemplo, los genitales) la acetilcolina liberada por las terminales parasimpáticas se une a los receptores M_2 vasculares e induce vasodilatación dependiente del endotelio. Modificado de Klabunde, 2005.

1.3 Transmisión no adrenérgica/no colinérgica

Como se describió previamente, el sistema nervioso autónomo ejerce control sobre los vasos sanguíneos a través de la liberación de noradrenalina (sistema nervioso simpático) o acetilcolina (sistema nervioso parasimpático). Sin embargo, se ha demostrado que existen otros transmisores que se liberan de las terminales nerviosas autonómicas. Dicha transmisión es denominada no

adrenérgica/no colinérgica. Los principales transmisores no adrenérgicos/no colinérgicos son péptidos, purinas y óxido nítrico (Broadley, 1996b).

Las terminaciones nerviosas sensoriales de las neuronas aferentes primarias, además de transmitir los impulsos de estímulos nociceptivos hacia el sistema nervioso central, también tienen la capacidad de liberar sustancias bioactivas. La estimulación de la aferente primaria induce un reflejo axonal que conlleva a la liberación de dichos neuropéptidos. Los neuropéptidos inducen vasodilatación e incrementos en la permeabilidad vascular (Broadley, 1996b).

Kawasaki et al. (1988) demostraron, en arterias mesentéricas, que se podían inducir respuestas vasodilatadoras mediadas por nervios no adrenérgicos/no colinérgicos. Además, dicha vasorrelajación se abolía cuando se depletaba el CGRP de neuronas sensoriales perivasculares. A partir de ese momento, los autores propusieron al CGRP como un nuevo neurotransmisor vasodilatador. El CGRP desempeña un papel importante en el control del tono vascular a través de un mecanismo local (Kawasaki et al., 1988).

Posteriormente, en estudios *in vivo*, se observó que la estimulación de la médula espinal resultaba en respuestas depresoras neurogénicas mediada por nervios no adrenérgicos/no colinérgicos. Dichas respuestas se veían disminuidas en presencia de un antagonista del receptor a CGRP. Por lo anterior, se sugirió que la transmisión no adrenérgica/no colinérgica estaba mediada principalmente por la liberación de CGRP de neuronas sensoriales perivasculares (Taguchi et al., 1992).

1.3.1. Péptido relacionado al gen de la calcitonina

El péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), es un péptido de 37 aminoácidos que se localiza principalmente en las fibras sensoriales C y A δ . Las fibras sensoriales están distribuidas en el organismo. Se encuentran en el tejido perivascular llevando a cabo funciones tanto sensoriales como efectoras

(Russell et al., 2014). Existen dos isoformas de CGRP, α -CGRP y β -CGRP, que tienen estructuras y actividad biológica similares pero originadas por genes diferentes. El α -CGRP es la isoforma mayormente expresada tanto a nivel de sistema nervioso central como periférico (Amara et al., 1985).

El CGRP es un potente vasodilatador y sus efectos del CGRP han sido ampliamente demostrados en distintos vasos sanguíneos. Además, su acción vasodilatadora es inhibida al administrar antagonistas selectivos para el receptor a CGRP. Asimismo, se han observado respuestas cronotrópicas e inotrópicas positivas en el corazón en suma a los efectos vasodilatadores inducidos por administración intravenosa de CGRP (Ando et al., 1990; Brain y Grant, 2004).

El CGRP puede actuar por diferentes vías de señalización que involucran tanto vasorrelajación dependiente e independiente de endotelio. La vía independiente de endotelio la que se observa con mayor frecuencia (Fig. 7) (Russell et al., 2014).

La administración de CGRP induce aumento de las concentraciones intracelulares de AMPc incluso en ausencia de endotelio. Lo anterior sugiere que el CGRP estimula directamente la AC en células del músculo liso vascular (CMLV). Asimismo, el CGRP estimula un receptor endotelial que activa la vía del óxido nítrico (NO). El NO puede difundir hacia las células del músculo liso vascular para mediar la vasorrelajación inducida por la activación de la guanilato ciclasa (GC) (Russell et al., 2014)

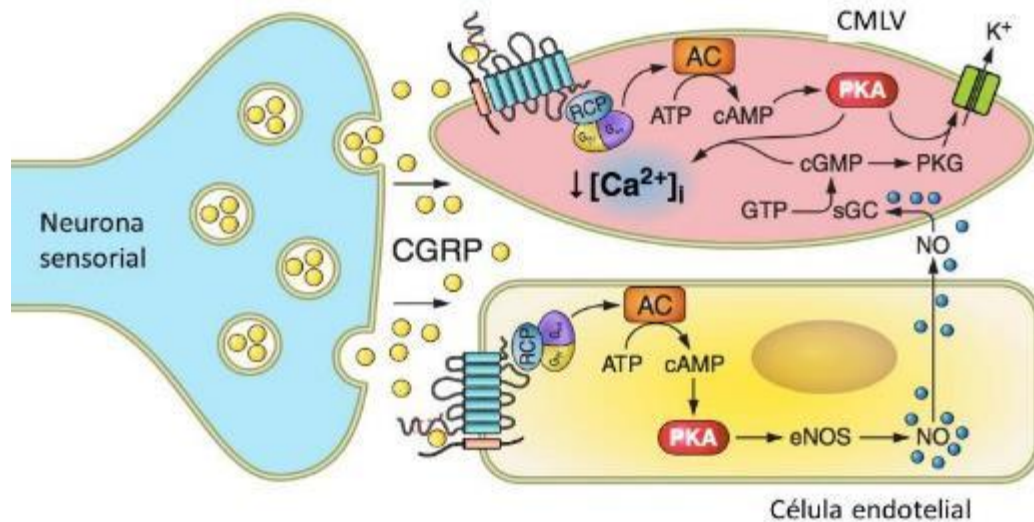


Fig. 7 Vías de señalización del CGRP. El CGRP induce vasodilatación por dos mecanismos: 1) activando directamente su receptor en el músculo liso vascular y mediando la relajación por la proteína Gs; y 2) activando receptores en las células endoteliales para promover la producción de NO, el cual puede difundir al músculo liso vascular para mediar la relajación vía activación de la sGC. CMLV, célula del músculo liso vascular; AC, adenilato ciclasa; PKA, cinasa dependiente de AMP; sGC, guanilato ciclasa soluble; PKG, cinasa dependiente de GMP; NO, óxido nítrico; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial. Modificado de Russell, 2014.

1.4 Neurotransmisión en la unión neuroefectora

La transmisión en la unión neuroefectora, así como en la sinapsis, está basada en una secuencia de eventos que inician con un potencial de acción en la terminal pre-unional. El cambio en el potencial de membrana generado por el potencial de acción produce la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. El influjo rápido de Ca^{2+} permite que las vesículas se fusionen con la membrana plasmática de la neurona pre-unional induciendo la liberación de los neurotransmisores a la unión neuroefectora. Los transmisores se unen a receptores específicos en el órgano efector produciendo un efecto que depende del tipo de transmisor (Purves, 2004; Westfall y Westfall, 2011).

Existen diferencias en el almacenamiento y síntesis de los neurotransmisores dependiendo de si se trata de moléculas pequeñas (transmisores clásicos,

como ACh y NA) o moléculas grandes (neuropéptidos como CGRP y sustancia P (SP) (Fig. 8) (Katzung, 2013; Purves, 2004; Westfall y Westfall, 2011).

La síntesis de transmisores clásicos ocurre localmente dentro de las terminales pre-unionales. Las enzimas necesarias para la síntesis de estos transmisores son producidas en el soma de la neurona y son transportadas a la terminal nerviosa por un mecanismo denominado transporte axonal lento. Las moléculas precursoras que se requieren son usualmente introducidas a las terminales nerviosas por transportadores que se encuentran en la membrana plasmática de la terminal. Las enzimas sintetizan los transmisores en el citoplasma de la terminal pre-unional a partir de los precursores y son almacenados en vesículas a través de transportadores vesiculares. Hay moléculas cuyo último paso de la síntesis se lleva a cabo una vez dentro de la vesícula, como es el caso de la noradrenalina. En general, las vesículas de los transmisores pequeños miden de 40 a 60 nm de diámetro y son denominadas vesículas pequeñas de núcleo claro (Purves, 2004).

Los neuropéptidos son sintetizados en el soma de las neuronas, lo que significa que se encuentran lejos de su sitio de secreción. Las vesículas conteniendo neuropéptidos son transportadas a lo largo del axón hacia la terminal nerviosa, por un mecanismo denominado transporte axonal rápido. Además, los neuropéptidos son almacenados en vesículas de 90 a 250 nm de diámetro que son denominadas vesículas grandes de núcleo denso (Purves, 2004).

Una vez que el neurotransmisor ha sido secretado y ha realizado su función, tiene que ser removido de la unión neuroefectora. Los mecanismos de remoción de los neurotransmisores son la difusión, la recaptura, la degradación o una combinación de dichos mecanismos. Los neuropéptidos únicamente pueden ser eliminados por degradación mediante enzimas proteolíticas (Katzung, 2013; Purves, 2004; Westfall y Westfall, 2011).

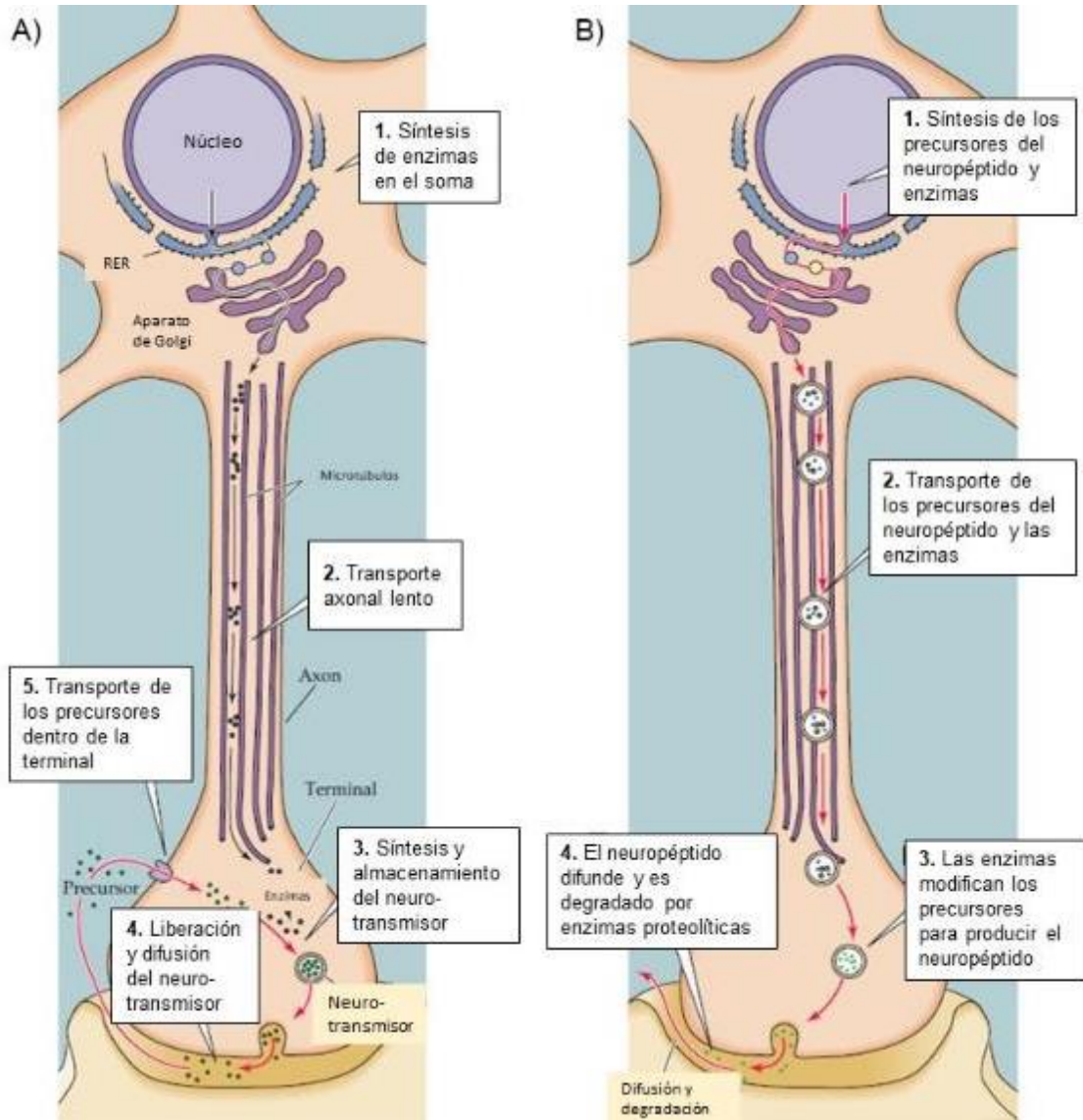


Fig. 8. Síntesis y degradación de: A) neurotransmisores clásicos, (1) Las enzimas necesarias para la síntesis del neurotransmisor son sintetizadas en el soma de la neurona presináptica; (2) son transportadas hacia el axón por transporte axonal lento. (3) Los precursores se recapturan dentro de las terminales por transportadores específicos, y la síntesis de neurotransmisores y la vesiculación se llevan a cabo dentro de la terminal nerviosa. (4) Se fusiona la vesícula y se libera el transmisor; (5) después de ser liberado el neurotransmisor puede ser degradado enzimáticamente y el neurotransmisor o sus metabolitos son recapturados para empezar de nuevo el ciclo; y B) neuropéptidos, (1) tanto las enzimas como los neuropéptidos son sintetizados en el soma de la neurona presináptica. (2) Las enzimas y los propéptidos son vesiculados en el aparato de Golgi y viajan a la terminal por transporte axonal rápido. (3) Las enzimas modifican los propéptidos para producir uno o más neuropéptidos. (4) Después de la fusión de la vesícula y la exocitosis, los neuropéptidos difunden del espacio sináptico y son degradados por enzimas proteolíticas. Modificado de Purves, 2004.

1.5 Neurotransmisión mediada por gases

1.5.1 Óxido nítrico

En el sistema nervioso central los gasotransmisores participan en un gran número de procesos de señalización durante la sinapsis. En ese sentido, se sabe que el NO sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa neural (nNOS), está implicado en la modulación de procesos fisiológicos. El NO regula procesos tales como el aprendizaje, la memoria, la neurogénesis y la presión sanguínea (Zhou y Zhu, 2009). La inhibición de la nNOS deteriora los procesos de aprendizaje y memoria en modelos animales (Böhme et al., 1993; Hölscher y Rose, 1992).

El NO sintetizado por la nNOS regula la neurogénesis (Li Zhou y Zhu, 2009). En la zona subventricular y el bulbo olfatorio de ratas adultas, se ha demostrado que el NO es un inhibidor fisiológico de la neurogénesis (Matarredona et al., 2004). En el hipocampo, el papel del NO sobre la proliferación celular sigue siendo controversial (Packer et al., 2003; Zhang et al., 2001; Zhou et al., 2007). Además, el bloqueo de la actividad de la nNOS, en el hipotálamo y en la médula rostral ventromedial causa hipertensión sistémica (Toda et al., 2009). Lo anterior sugiere un papel del NO en la regulación de la presión sanguínea en el SNC (el Karib et al., 1993; Sakuma et al., 1992; Togashi et al., 1992).

En el sistema nervioso periférico, el NO derivado de la nNOS media mecanismos importantes en la transducción de señales. Diversos tejidos periféricos, en especial músculo liso, reciben inervación que expresa la nNOS y, por tanto, generan y libera NO (nervios nitrérgicos). Por tanto, el NO se libera como un transmisor atípico que estimula la guanilato ciclasa (GC) en la célula efectora induciendo relajación del músculo liso (Förstemann, 2000).

1.5.2 Sulfuro de hidrógeno

A pesar de que el H₂S por sí mismo no tiene ningún efecto sobre la actividad sináptica, puede potenciar la actividad de sinapsis activas e induce la LTP hipocampal (Abe y Kimura, 1996). El NO y el CO son conocidos por ser neurotransmisores retrógrados que no requieren de la activación de los receptores NMDA para inducir la LTP (O'Dell et al., 1991; Zhuo et al., 1993). Tanto el NO como el CO activan la GC para producir GMPc (Abe y Kimura, 1996; Garthwaite et al., 1988; Verma et al., 1993). Por su parte, el H₂S es capaz de potenciar la actividad de los receptores NMDA que han sido previamente activados por el neurotransmisor glutamato (Abe y Kimura, 1996).

Tanto el H₂S como la excitación neuronal inducen influjo de Ca²⁺ en astrocitos, dicha respuesta se propaga a los astrocitos circundantes como ondas de Ca²⁺ (Nagai et al., 2004). El influjo de Ca²⁺ inducido por H₂S se suprime con la aplicación de inhibidores de los receptores de potencial transitorio (TRP), tales como La³⁺, Gd³⁺ y rojo de rutenio. Los astrocitos activados por excitación neuronal liberan moléculas de señalización como glutamato, ATP, TNF- α , D-serina y posiblemente H₂S (Bezzi et al., 2001; Fellin et al., 2004; Ishigami et al., 2009; O. Pascual et al., 2005).

2. ANTECEDENTES

2.1 Sulfuro de Hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es el más simple de los tioles encontrados en las células. Desde el primer reporte de su potencial función fisiológica (Abe y Kimura, 1996) se han incrementado las investigaciones acerca de la señalización del mismo. El H_2S se unió al óxido nítrico (NO) y al monóxido de carbono (CO) como el tercer miembro de los gasotransmisores (Mustafa et al., 2009; Wang, 2002, 2003).

La identidad del H_2S como el tercer gasotransmisor se valida contra seis criterios de los gasotransmisores (Wang, 2002, 2014):

- ✓ El H_2S es una molécula gaseosa pequeña, una vez producida dentro de las eucariotas es parcialmente disuelto en medio biológico en su forma libre o parcialmente disociado.
- ✓ El H_2S permea libremente a través de las membranas plasmática
- ✓ El H_2S es generado endógenamente en las células de los mamíferos, tanto bajo condiciones fisiológicas como en condiciones patofisiológicas.
- ✓ El H_2S posee funciones específicas bien definidas y concentraciones fisiológicas relevantes. Los efectos del H_2S sobre el sistema cardiovascular, nervioso, respiratorio y gastrointestinal, han sido extensa y concretamente documentados. La concentración fisiológica del H_2S y sus funciones son relevantes ya que modificaciones de los niveles endógenos de H_2S han sido claramente correlacionados con cambios funcionales en diferentes sistemas.
- ✓ La aplicación de donadores de H_2S , sin importar si son de liberación rápida o lenta, presenta efectos similares a los del H_2S endógeno en diferentes sistemas biológicos.

- ✓ El H₂S está involucrado en la transducción de señales y tiene objetivos celulares y moleculares específicos. Induce cambios covalentes en diversas proteínas; regula la actividad y los niveles de segundos mensajeros como el GMPc, AMPc y el calcio intracelular.

La importancia fisiológica y biomédica del sulfuro de hidrógeno ha sido ampliamente reconocida en el sistema cardiovascular, así como en el resto del cuerpo humano. Actualmente se han reportado numerosas funciones fisiológicas reguladas total o parcialmente por el H₂S. Dentro de dichas funciones destacan la vasodilatación (Mustafa et al., 2011); neurotransmisión (Abe y Kimura, 1996), angiogénesis (Papapetropoulos et al., 2009); inflamación (Whiteman y Winyard, 2011), entre otras (Wang, 2012).

Las concentraciones fisiológicas de H₂S pueden variar de acuerdo al método que se utilice para cuantificarlas. En un método en donde los homogenados fueron mezclados, se midió el H₂S por cromatografía de gases y se reportaron niveles de 14 nM en el cerebro y 17 nM en el riñón (Furne et al., 2008). En otro método, en el cual el H₂S es atrapado como Ag₂S sobre la superficie de partículas de plata, se encontraron concentraciones menores a 9.2 μM en homogenados de cerebro (Ishigami et al., 2009).

En cuanto a las concentraciones sanguíneas de H₂S, cuando se cuantifica por el método de monobromobimano, el cual se une selectivamente a los grupos tioles permitiendo la cuantificación de H₂S, se reportan concentraciones en el rango 0.4 a 0.9 μM (Kimura, 2012b; Wintner et al., 2010). Por otra parte, cuando el H₂S se mide por cromatografía de gases las concentraciones sanguíneas se reportan aproximadamente en 8 nM (Levitt et al., 2011).

Para el estudio de la función del H₂S en múltiples sistemas se han empleado varias herramientas farmacológicas incluyendo el NaHS o el Na₂S como donadores inorgánicos de H₂S (Papapetropoulos et al., 2015). Sin embargo, hay que considerar que cuando estas sales son disueltas en agua, el H₂S se

disocia en $\text{HS}^- + \text{H}^+$. Así, en solución acuosa, cerca del 20% de H_2S se encuentra en forma de gas mientras que el resto se encuentra disociado (Li y Lancaster, 2013).

Además, existen donadores orgánicos de origen natural que incluyen dialiltrisulfuros (DATS) y dialildisulfuros (DADS) (Benavides et al., 2007) y de origen sintético como el GYY413 (Li et al., 2008).

2.1.1 Historia del sulfuro de hidrógeno

La historia del H_2S comienza en 1700 con las observaciones de médico italiano Bernardino Ramazzini, mismo que ahora es considerado como el padre fundador de la medicina ocupacional (Felton, 1997). Bernardino Ramazzini describió la inflamación e irritación, de los ojos, inducidas por el “gas de las alcantarillas” en trabajadores del alcantarillado. A pesar de no conocer la naturaleza química del “gas de las alcantarillas”, se creía que dicha sustancia era responsable del mal olor del excremento y que podía dañar los pulmones (Szabo, 2017).

En 1770, los parisinos experimentaron muchos accidentes debido al gas que se emanaba del sistema de alcantarillado de la ciudad. Se describieron dos tipos de envenenamiento por “gas de las alcantarillas”: 1) irritación e inflamación de los ojos; y 2) asfixia. El H_2S fue asociado con dichos reportes y surgió el concepto de “intoxicación por H_2S ” (Szabo, 2017). En 1775, el H_2S fue sintetizado como una sustancia químicamente pura, a partir de sulfuro ferroso (pirita) con ácido mineral (Nicholls y Kim, 1981) pero fue hasta 1806 cuando se confirmó la presencia de H_2S en las alcantarillas de París (Dupuytoren, 1806).

Los primeros experimentos en animales fueron realizados en caballos (1803) y demostraron los efectos letales del H_2S cuando era absorbido a través de la piel mientras los animales respiraban aire fresco (Szabo, 2017). Estudios

subsecuentes en los que se inyectaron soluciones saturadas de H₂S reportaron efectos respiratorios, convulsiones, asfixia e incluso la muerte con dosis altas (Szabo, 2017). La administración intravenosa de H₂S inducía un cambio en la coloración de la sangre que más tarde fue atribuido a la reacción con la hemoglobina y la subsecuente producción de sulfohemoglobina (Mitchell y Davenport, 1924). Dentro de los siguientes 150 años, se realizaron múltiples investigaciones sobre los efectos toxicológicos del H₂S en varias especies incluyendo humanos (Beauchamp et al., 1984; Chou et al., 2016; Mitchell y Davenport, 1924; Szabo, 2017).

Actualmente, se acepta que los efectos toxicológicos del H₂S son producidos a través de la inhibición de la cadena respiratoria por inhibición del complejo IV mitocondrial (citocromo C oxidasa) (Ammann, 1986; Krahl et al., 1941). Sin embargo, los mecanismos de acción del H₂S para producir sus efectos toxicológicos son complejos. Es posible que el H₂S interactue con diversas proteínas tanto intracelulares como extracelulares a través de reacciones de sulfhidración (Paul y Snyder, 2015b).

En 1934, Du Vigneaud descubrió la vía de la transulfuración, una ruta metabólica que involucra la interconversión entre cisteína y homocisteína a través de la cistationina (Du Vigneaud et al., 1934). Posteriormente, se midió la producción de cisteína a partir de homocisteína en homogenados de hígado para demostrar la producción de H₂S (Binkley y Du Vigneaud, 1942).

En 1989 fue encontrado H₂S en tejido cerebral (Goodwin et al., 1989; Warenycia et al., 1989), lo cual sugirió que el H₂S producido endógenamente podría tener algún papel fisiológico. Más tarde se demostró que la cistationin-β-sintetasa (CBS) se encontraba altamente expresada en el cerebro (Abe y Kimura, 1996). También se demostró que el H₂S actúa como neuromodulador aumentando la potenciación a largo plazo mediada por los receptores NMDA (Abe y Kimura, 1996).

Posteriormente, se descubrió una segunda enzima capaz de producir H₂S (cistationin-γ-liasa; CSE) que se expresaba ampliamente en el hígado, riñón, aorta e ileum de cobayo (Finkelstein, 1990; Ishii et al., 2004). Por tanto, se especuló el posible efecto relajante del H₂S sobre el músculo liso (Hosoki et al., 1997). Lo anterior abrió paso a que diferentes investigadores establecieran el efecto relajante de dicho gas sobre el músculo liso vascular (Dombkowski et al., 2004; Zhao et al., 2001a). Además, a partir de homogenados de cerebro provenientes de ratones *knock out* para la CBS, se descubrió que existían otras enzimas involucradas en la biosíntesis del H₂S. Dichas enzimas fueron identificadas como 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa y cistationinamino transferasa (3-MST y CAT) (Cooper, 1983; Shibuya et al., 2009; Taniguchi y Kimura, 1974; Ubuka et al., 1978).

2.1.2 Biosíntesis del sulfuro de hidrógeno

El H₂S puede ser producido fisiológicamente en el cuerpo por al menos tres enzimas: cistationin-γ-liasa (CSE); cistationin-β-sintasa (CBS) y 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST). CBS y CSE son dependientes del fosfato de piridoxal y utilizan L-cisteína como sustrato. 3-MST no es dependiente del fosfato de piridoxal y utiliza 3-mercaptopiruvato como sustrato (Shibuya et al., 2009; Yu et al., 2014).

En los últimos años, se ha centrado la atención en la bioquímica y biología molecular de las enzimas que sintetizan H₂S. Se conoce sobre mecanismos de biosíntesis del H₂S. Se conoce la especificidad con los sustratos, los cofactores requeridos, así como la distribución de cada una de las enzimas. Actualmente, se sigue buscando evidencia concreta acerca de los cambios en la expresión o la actividad de las enzimas en estados patológicos.

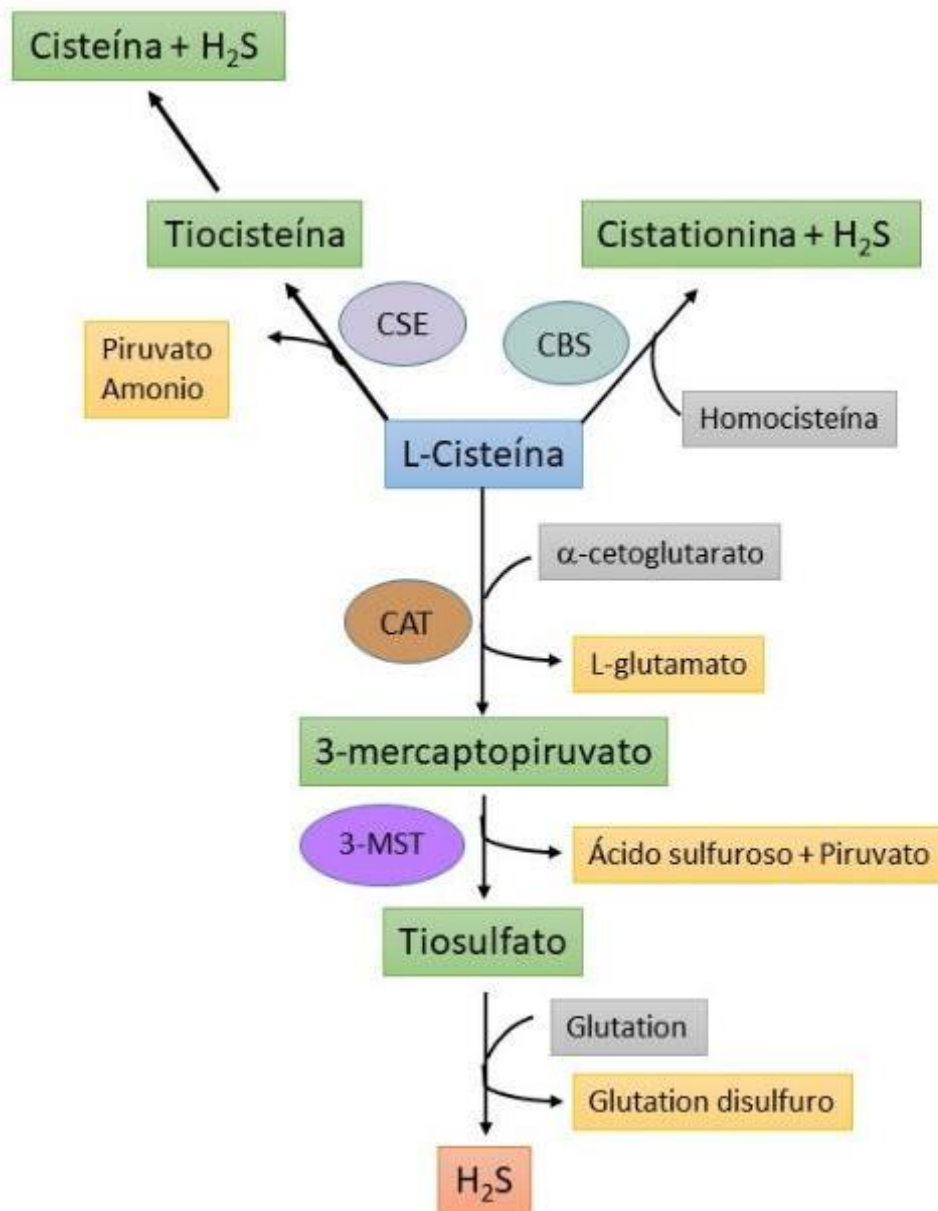


Fig. 9. Biosíntesis de sulfuro de hidrógeno. El sustrato para la producción de H_2S es la L-cisteína. El H_2S producido por la CBS está asociado con la condensación de homocisteína con L-cisteína para producir cistationina y H_2S . La CSE cataliza el paso de L-cisteína a piruvato, amonio y tiocisteína. La tiocisteína se degrada a cisteína y H_2S . La CAT estimula la liberación de 3-mercaptopiruvato y L-glutamato catalizando la reacción de L-cisteína y α -cetoglutarato. La 3-MST cataliza la reacción de 3-mercaptopiruvato a ácido sulfuroso, piruvato y tiosulfato. Con la ayuda del glutatión reducido, el tiosulfato es reducido a H_2S y disulfuro de glutatión. CSE, Cistationin- β -liasa; CBS, Cistationin- γ -sintasa; CAT, Cistationin-amino transferasa; 3-MST, 3-mercaptopiruvato-sulfur-transferasa. Modificado de Yu, 2014.

2.1.3 Sulfhidración de proteínas

Una de las formas de señalización del H_2S es la modificación de los residuos de cisteína en diversas proteínas. Dicho proceso ha sido denominado sulfhidración o persulfidación (Mustafa et al., 2009) y tiene un principio similar a la nitrosilación de proteínas. El H_2S no puede modificar directamente los residuos de cisteína que se encuentren reducidos, por lo que primero tiene que llevarse a cabo una reacción de oxidación antes de la modificación del residuo (Paul y Snyder, 2015a).

Se ha reportado que el H_2S puede generar persulfuros cuando reacciona con grupos tioles oxidados o disulfuros. La sulfhidración de proteínas puede ocurrir de distintas maneras. La primera de ellas es a través del ataque nucleofílico del sulfuro sobre un residuo de cisteína oxidado tal como los ácidos sulfónicos de cisteína (Cys-SOH) o los disulfuros de cisteína (-S-S-). La segunda es una reacción entre una especie de sulfuro oxidada, como los polisulfuros, y el grupo tiol de la cisteína. Por último, a través de la reacción de disulfuro de hidrógeno (H_2S_2) con el grupo tiol de la cisteína (Fig. 10) (Paul y Snyder, 2015a, 2015b).

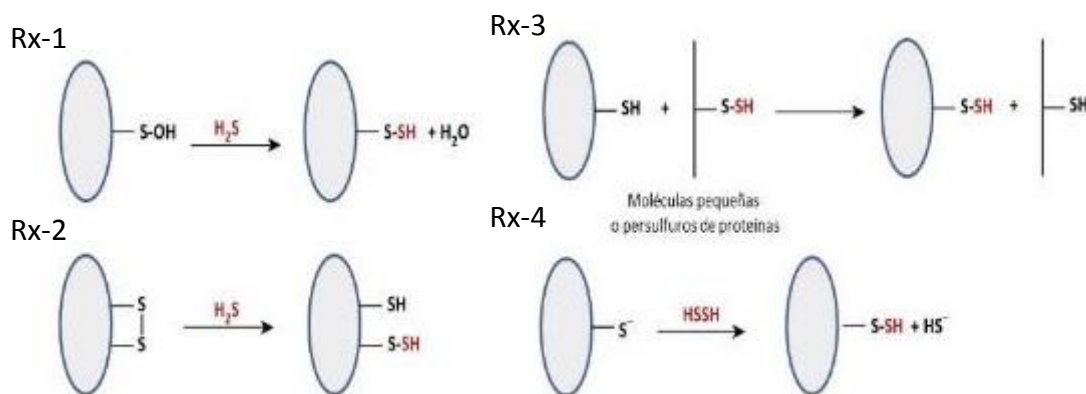


Fig. 10. Mecanismos de sulfhidración de proteínas. La sulfhidración puede ocurrir por la reacción en el sulfuro con residuos de cisteína oxidada (Rx 1 y Rx 2). También puede ocurrir cuando un persulfuro existente reacciona con un tiol-cisteína (Rx 3). La reacción de H_2S_2 con tiolatos de cisteína también pueden llevar a sulfhidración (Rx 4). Modificado de Paul y Snyder, 2015.

2.1.4 Metabolismo del sulfuro de hidrógeno

Para mantener un balance fisiológico apropiado, el H_2S puede ser eliminado a través de 3 rutas (Fig. 11). Primero, la oxidación mitocondrial puede convertir el H_2S en tiosulfato, para una posterior conversión a sulfito y finalmente en sulfato. El sulfato es el principal producto final del metabolismo del sulfuro de hidrógeno (Kimura, 2012a). La oxidación de cisteína puede incrementar los niveles de sulfato en orina. Las concentraciones de tiosulfato urinario pudieran actuar como un marcador específico de la síntesis de H_2S en el organismo (Yu et al., 2014). La segunda vía metabólica es la metilación a dimetilsulfuro en el citosol por medio de la enzima tiol-S-metiltransferasa. La última vía descrita es la unión del H_2S a la hemoglobina llevando a la formación de sulfohemoglobina (Kimura, 2013).

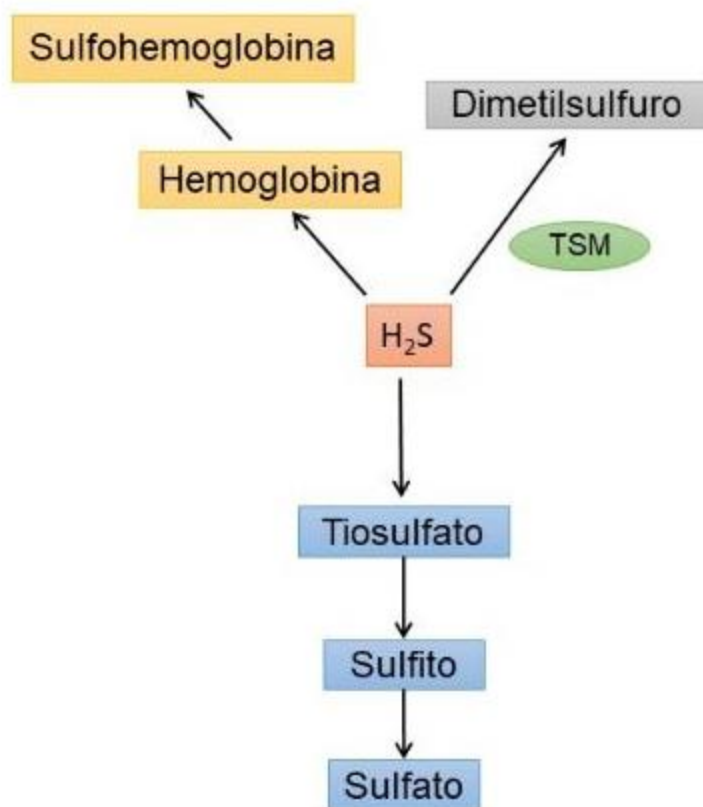


Fig. 11. Metabolismo del sulfuro de hidrógeno. El H_2S es oxidado a tiosulfato, seguido de la producción de sulfito. El sulfito se convierte a sulfato. La tiol-s-metiltransferasa cataliza la conversión de H_2S a dimetilsulfuro. Además, el H_2S reacciona con la hemoglobina para formar sulfohemoglobina. TSM, tiol-S-metiltransferasa. Modificado de Yu, 2014

2.1.5 Sulfuro de hidrógeno en el sistema cardiovascular

El H₂S media respuestas complejas en el sistema cardiovascular tales como cardioprotección y vasculoprotección (Wang, 2012). En vasos sanguíneos aislados, este gasotransmisor produce relajación mediada principalmente por activación de los canales K_{ATP} (Tang et al., 2005). En ratas bajo anestesia el NaHS, un donador de H₂S, induce hipotensión (Ali et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos que subyacen a dicha hipotensión son complejos y pudieran involucrar distintas vías de señalización.

Se ha reportado que las respuestas hipotensoras inducidas por NaHS, en ratas anestesiadas, no están inducidas por la liberación de NO, canales de K⁺, canales de K⁺ de gran conductancia (BK_{Ca}), GMPc, metabolitos del ácido araquidónico o de la epoxigenasa p450. Asimismo, dichas respuestas tampoco están mediadas por los sistemas adrenérgico o colinérgico, ya que la administración de atropina, fentolamina o hexametonio no modifican las respuestas hipotensoras (Yoo et al., 2015).

Asimismo, a concentraciones fisiológicas, el H₂S induce relajación de la aorta de rata, así como una reducción transitoria de la presión sanguínea. Se ha sugerido que dichos efectos del H₂S son mediados por una directa estimulación de los canales K_{ATP} con la subsecuente hiperpolarización de las CML's (Siebert et al., 2008; Sun et al., 2011). La inhibición de la producción de H₂S con propargilglicina (PPG) reduce las corrientes de K_{ATP} (Fitzgerald et al., 2014).

Por otra parte, hay evidencia que demuestra que el H₂S produce inhibición de la función cardíaca (Geng et al., 2004). En corazón de rata aislado, el NaHS induce respuestas cronotrópicas e inotrópicas negativas (Geng et al., 2004; Porokhya et al., 2012). En corazones aislados perfundidos con la técnica de Langendorff, el NaHS produjo: (1) disminución del (\pm)-LV dp/dt_{max} a 10⁻⁶-10⁻⁹ mol/L, lo que sugiere una respuesta inotrópica negativa (Geng et al., 2004); (2)

lusitropismo negativo (Mazza et al., 2013); (3) cronotropismo negativo a concentraciones de NaHS de 10^{-3} mol/L (Geng et al., 2004).

A pesar de las evidencias anteriores, los mecanismos involucrados en los efectos cardiovasculares anteriormente descritos siguen sin ser completamente elucidados. Se ha demostrado que, la glibenclamida bloquea parcialmente las respuestas inotrópicas negativas inducidas por NaHS, lo que sugiere la participación de los K_{ATP} en dicha respuesta. Por otra parte, 10^{-9} M de NaHS aumenta la fosforilación de Akt (Ser⁻⁴⁹³) y la eNOS (Ser⁻¹¹⁷⁷) en el corazón de ratas. La activación de dicha vía pudiera estar mediando los efectos inotrópicos negativos del NaHS (Mazza et al., 2013). Asimismo, el NaHS inhibe los canales de Ca^{2+} tipo L, inhibiendo los transitorios de Ca^{2+} inducidos por isoproterenol (Sun et al., 2008; Zhang et al., 2012). Además, disminuye la actividad de SERCA2 asociado con fosfolamban (Chen et al., 2012).

Por otra parte, en ratas anestesiadas, la administración intravenosa de NaHS produce bradicardia dependiente de la dosis. Se ha demostrado que, dicha respuesta no está mediada por la liberación de NO, canales de K^+ , canales BK_{Ca} , GMPc, liberación de metabolitos de ácido araquidónico o por los sistemas adrenérgico o colinérgico (Yoo et al., 2015).

Diversos estudios han demostrado que el H_2S puede facilitar o inhibir la neurotransmisión periférica. En ese sentido, se observó que el GYY4137 promueve la liberación de neuropéptidos como el CGRP en el cuello de la vejiga del cerdo (Fernandes et al., 2013) y de CGRP y PACAP en el uréter intravesical del cerdo (Fernandes et al., 2014). Además, la administración de distintos donadores de H_2S , incluyendo el NaHS, GYY4137 y L-cisteína, inhibe la liberación de [³H]noradrenalina inducida por estimulación eléctrica en cuerpos ciliares de iris de porcino (Kulkarni et al., 2009) y de uvea anterior de bovino (Salvi et al., 2016).

Asimismo, se demostró que el H₂S aumenta la liberación [³H]noradrenalina inducida por estimulación eléctrica en terminales nerviosas simpáticas post-ganglionares. En neuronas ganglionares el H₂S induce hiperpolarización inhibiendo la liberación de neurotransmisores (Dominguez-Rodriguez et al., 2017). Por último, la administración de NaHS atenúa de manera dosis dependiente la actividad de los nervios simpáticos renales en ratas anestesiadas (Guo et al., 2016).

Recientemente, se ha reportado que el H₂S al reaccionar con NO lleva a la producción de HNO. El HNO es capaz de activar receptores TRPA1 induciendo la liberación de CGRP de las aferentes primarias (Teicher et al., 2017). Asimismo, se ha demostrado que el H₂S junto con el NO regulan el tono vascular. Lo anterior se ha atribuido a la activación de la vía de señalización HNO-TRPA1-CGRP que puede inducir una vasodilatación local y sistémica (Eberhardt et al., 2014).

2.2 Modelo de la rata descerebrada y desmedulada

El modelo de rata descerebrada y desmedulada fue originalmente descrito en 1947 (Shiple y Tilden, 1947). Con el paso del tiempo han ido surgiendo diversas modificaciones para ampliar el alcance de dicho modelo (Gillespie et al., 1970; Gillespie y Muir, 1967). El objetivo del modelo sigue siendo investigar y estudiar los efectos cardiovasculares de diferentes fármacos y sus mecanismos de acción, en condiciones *in vivo*, sin la influencia del SNC. La destrucción del SNC permite excluir los mecanismos regulados por dicho sistema. Dichos mecanismos pueden modificar considerablemente los efectos de los fármacos sobre la resistencia vascular periférica y la frecuencia cardíaca.

Una de las limitaciones de este modelo experimental es la ausencia de la influencia del SNC en las respuestas cardiovascular de los fármacos. Por tanto, los resultados obtenidos, sobre nuevos fármacos o compuestos, en el

modelo experimental de la rata descerebrada y desmedulada deben ser interpretados con prudencia y ser confirmados con algún otro modelo como el de la rata anestesiada o rata consciente. A pesar de dicha limitación, este modelo experimental permite la investigación de compuestos que actúan sobre el sistema cardiovascular (Centurión et al., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La administración con distintos donadores de H₂S puede ser útil en el tratamiento de la hipertensión y otras patologías relacionadas con el sistema cardiovascular. Por lo anterior, es importante el entendimiento de los mecanismos por los cuales el H₂S produce sus efectos cardiovasculares. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que distintos donadores de H₂S, tales como el NaHS, GYY4137 o L-Cys modulan la neurotransmisión en neuronas simpáticas. A pesar de las evidencias anteriormente descritas, los efectos del H₂S sobre la modulación del tono simpático y sensorial en el sistema cardiovascular no han sido estudiados. Al respecto, es posible que el H₂S regule la liberación de neurotransmisores del sistema nervioso simpático y el sistema nervioso sensorial perivascular (Fig. 12).

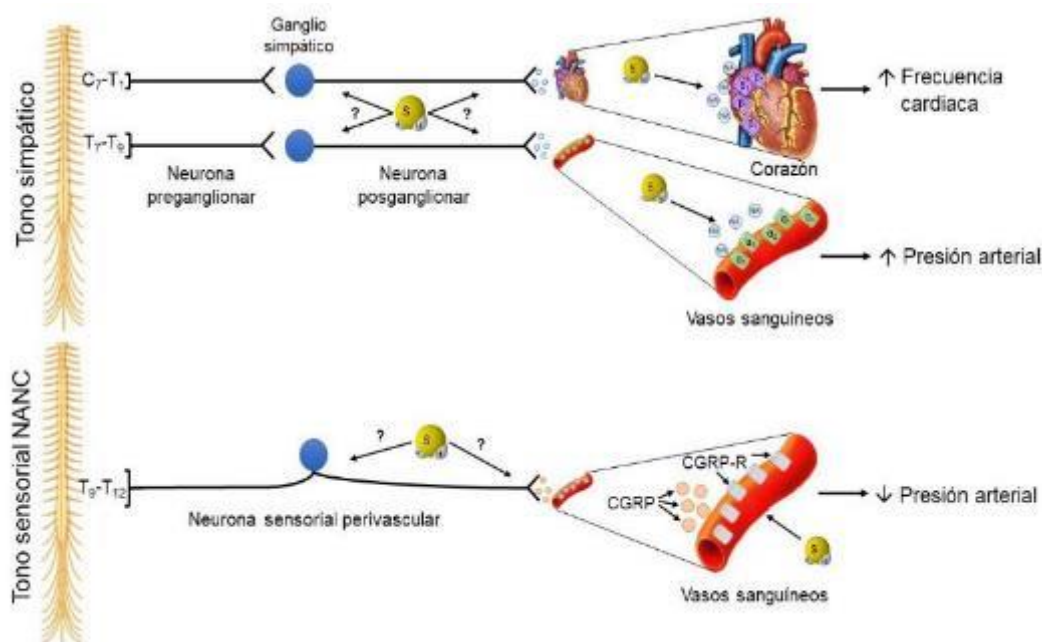


Fig. 12 Posible interacción del H₂S con el sistema nervioso simpático y el sistema sensorial no adrenérgico no colinérgico. Se desconoce si el H₂S interacciona a nivel pre-unional (sobre las neuronas simpáticas o sensoriales) o post-unional (con los receptores en el órgano efector).

4. HIPÓTESIS

La infusión continua de NaHS, un donador de H₂S, disminuirá las respuestas vasopresoras y taquicárdicas por inhibición del tono simpático vasopresor y cardioacelerador sin interactuar con los receptores α o β adrenérgicos. Además, la infusión continua de NaHS incrementará la liberación de CGRP por estimulación del tono no adrenérgico/no colinérgico (NANC).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los efectos del NaHS, un donador de H₂S, sobre la modulación de las respuestas vasopresoras y taquicárdicas inducidas por estimulación selectiva del tono simpático vasopresor y cardioacelerador; así como sobre el tono no adrenérgico/no colinérgico (NANC) en el modelo de rata descerebrada y desmedulada.

5.2 Objetivos particulares

- 5.2.1. Determinar en el modelo de rata descerebrada y desmedulada el efecto del NaHS sobre:
 - 5.2.1.1. Las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación selectiva del tono simpático vasopresor o por administración exógena de noradrenalina y metoxamina.
 - 5.2.1.2. Las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación selectiva del tono simpático cardioacelerador o por administración exógena de noradrenalina e isoproterenol.
 - 5.2.1.3. Las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación selectiva del tono NANC o por administración exógena de α -CGRP.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un rango de peso inicial de 300 a 350 g. Los animales fueron alojados en jaulas de plástico en un cuarto con temperatura y humedad controlada (22 ± 1 °C, 50% HR) con periodos de luz-oscuridad 12/12 h con alimento y agua *ad libitum*, ubicado en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Coapa). Los procedimientos y el presente proyecto de investigación, así como la manipulación de los animales de experimentación, fueron realizados bajo los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en EUA (*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*, 2017) (No. Protocolo CICUAL 0102-14).

6.2 Rata descerebrada y desmedulada

Los animales fueron anestesiados con isoflurano (3%). La tráquea fue canulada y posteriormente las ratas fueron descerebradas y desmeduladas mediante la inserción de un estilete de acero inoxidable a través de la órbita ocular y el *foramen magnum* hasta el canal vertebral (Gillespie y Muir, 1967). Los animales fueron ventilados artificialmente con aire ambiental utilizando una bomba de presión positiva (7025 rodent ventilator, Ugo Basile, Comerio, VA, Italia) a 56 respiraciones por minuto con un volumen de 20 ml/kg (Kleinman y Radford, 1964). Después de realizar una vago-simpatectomía bilateral fueron canuladas: 1) las venas femorales izquierda y derecha, así como las venas yugulares izquierda y derecha para la administración de fármacos; y 2) la arteria carótida para el registro de la presión arterial y la frecuencia cardiaca por medio de un transductor de señal (P23 XL, Grass Technologies, Warwick, RI, USA). La presión sanguínea y frecuencia cardiaca fueron registradas simultáneamente utilizando una unidad de adquisición de datos (MP150A-CE, Biopac Systems Inc., Goleta, CA) y el software Acknowledge v4.0.1 (Biopac Systems Inc., Goleta, CA).

6.3 Estimulación selectiva del tono simpático vasopresor y cardioacelerador

El estilete de acero inoxidable fue reemplazado por un electrodo bipolar esmaltado excepto por 1 cm localizado a 9 cm de la punta, y fue colocado a la altura de las vértebras torácicas T₇-T₉ para estimular selectivamente los nervios simpáticos que inervan a los vasos sanguíneos; y a nivel de las vértebras C₇-T₁ para la estimulación del tono simpático cardioacelerador (Gillespie et al., 1970). Antes de la estimulación, los animales recibieron galamina (25 mg/kg) para evitar los espasmos inducidos eléctricamente. La estimulación del tono simpático vasopresor y cardioacelerador fue inducido con un estimulador de pulsos cuadrados S88X (Grass Technologies, Warwick, RI, U.S.A.) aplicando trenes monofásicos de 10s que consisten en pulsos cuadrados (2ms, 60V), a las siguientes frecuencias de estimulación: 1) 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 Hz, para el tono simpático vasopresor; y 2) 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 3.2 Hz, para el tono simpático cardioacelerador.

6.4 Estimulación del tono vasodepresor NANC

El estilete fue reemplazado por un electrodo esmaltado excepto 1.5 cm localizado a 9 cm de la punta, y fue colocado a la altura de las vértebras torácicas T₉-T₁₂. Posteriormente, se administró una infusión continua de hexametonio a la dosis de 2 mg/kg min para bloquear los receptores nicotínicos ganglionares y evitar la estimulación del tono simpático. Diez minutos después, se administró una infusión continua de metoxamina a la dosis de 15 µg/kg min para incrementar la presión arterial diastólica alrededor de 100 mm Hg. Bajo estas condiciones, se aplicaron trenes monofásicos de 10s que consisten en pulsos cuadrados (2 m s, 60V) a las frecuencias de 0.56, 1, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz para inducir respuestas vasodepresoras de manera dependiente de la frecuencia de estimulación.

6.5 Protocolo experimental

Se emplearán 174 ratas que fueron divididas en 3 grupos (Ver Fig. 2).

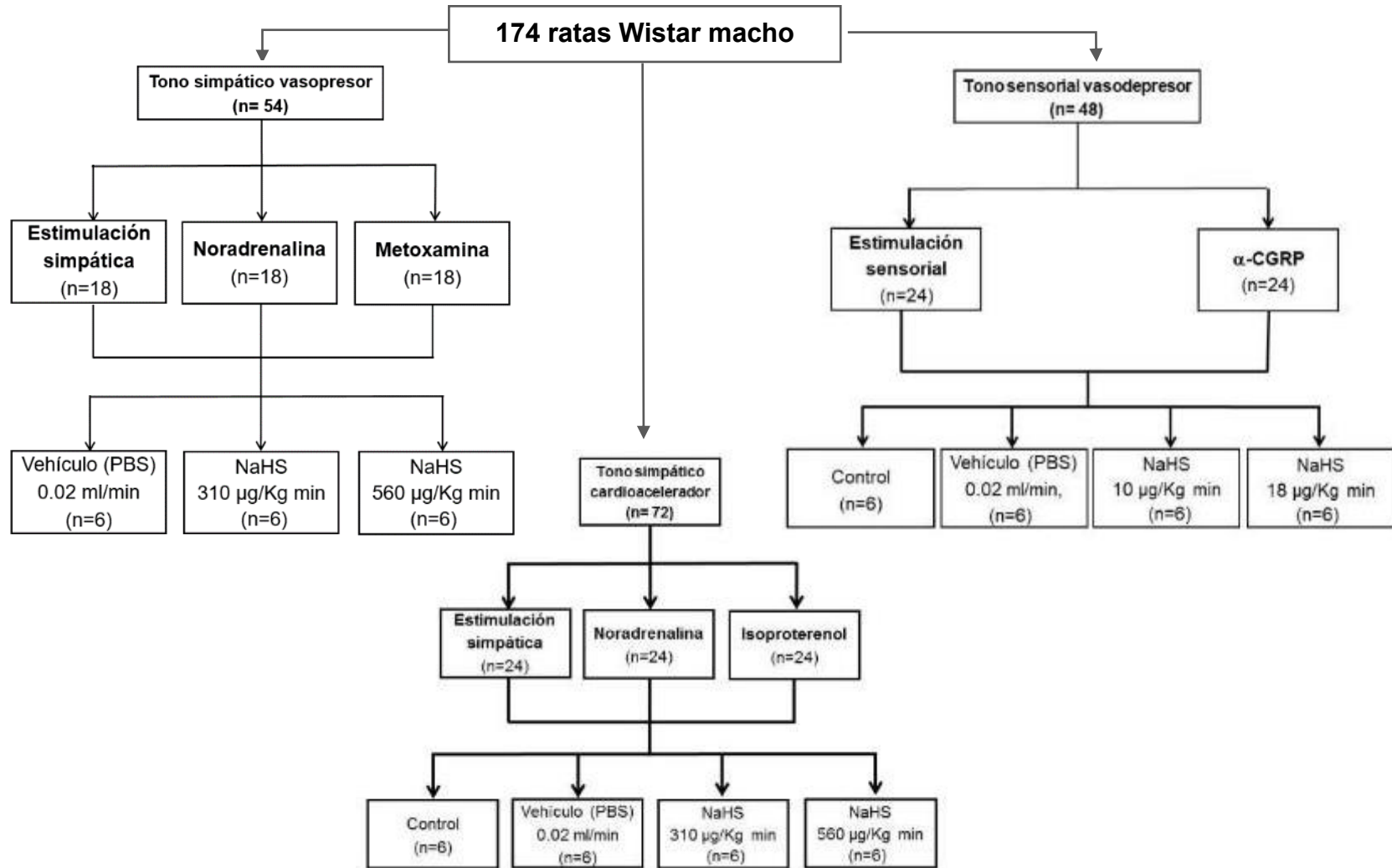


Fig. 13 Protocolo experimental general

6.5.1 Determinación del efecto del NaHS sobre el tono simpático vasopresor

Se utilizaron 54 animales, a los cuales se les realizó el procedimiento de descerebración y desmedulación anteriormente descrito. Después, los animales fueron divididos en dos grupos para genera respuestas vasopresoras inducidas por: 1) estimulación selectiva del tono simpático vasopresor (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 Hz) (n=18); o 2) bolos i.v. de noradrenalina exógena (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 µg/kg) y metoxamina (1, 3, 10, 30 y 100 µg/kg) (n=36). Dichas respuestas fueron investigadas bajo diferentes condiciones experimentales.

El primer grupo de ratas (n=18) fue dividido en 3 subgrupos (n=6 cada uno) que recibieron infusión i.v. continúa de: 1) PBS (Vehículo; 0.02 ml/min); 2) NaHS (310 µg/kg min); y 3) NaHS (560 µg/kg min), por medio de una bomba WPI modelo sp100i (World Precision Instruments Inc., Sarasota, FL, U.S.A.), durante 20 min. Posteriormente se realizó una nueva curva estímulo-respuesta bajo las infusiones anteriormente descritas. La infusión fue detenida una vez que se completó la segunda curva.

El segundo grupo de ratas (n=36) fue dividido en 2 subgrupos (n= 18 cada uno). Las respuestas vasopresoras fueron inducidas por bolos i.v. de: (1) noradrenalina exógena (0.03, 0.1, 0.3, 1, y 3 µg/kg); y (2) metoxamina (1, 3, 10, 30 y 100 µg/kg). Posteriormente cada subgrupo fue dividido en 3 (n=6 cada uno); los cuales recibieron una infusión i.v. continúa de: (1) PBS (vehículo; 0.02 ml/min); (2) NaHS (310 µg/kg min); y (3) NaHS (560 µg/kg min) durante 20 minutos. Inmediatamente después se realizó una segunda curva dosis-respuesta bajo las infusiones antes mencionadas. La infusión fue detenida una vez que se completó la segunda curva.

6.5.2 Determinación del efecto del NaHS sobre el tono simpático cardioacelerador

Se utilizaron 72 animales, a los cuales se les realizó el protocolo de descerebración y desmedulación anteriormente descrito. Después de dicho procedimiento, los animales fueron divididos en dos grupos para respuestas taquicárdicas inducidas por: (1) estimulación selectiva del tono simpático cardioacelerador (0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 3.2 Hz) (n=24); y (2) bolos i.v. de noradrenalina exógena (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) o isoproterenol (0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=48). Dichas respuestas fueron investigadas bajo diferentes condiciones experimentales.

El primer grupo de ratas (n=24) fue dividido en 4 subgrupos (n=6 cada uno) que recibieron infusión i.v. continúa de: (1) nada (control) (2) PBS (vehículo; 0.02 ml/min); (3) NaHS (310 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min); y (4) NaHS (560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min), por medio de una bomba WPI modelo sp100i, durante 20 minutos. Posteriormente se realizó una nueva curva estímulo-respuesta bajo las infusiones anteriormente descritas. La infusión fue detenida una vez que se completó la segunda curva.

El segundo grupo de ratas (n=48) fue dividido en 2 subgrupos (n= 24 cada uno). Las respuestas vasopresoras fueron inducidas por bolos i.v. de: (1) noradrenalina exógena (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$); e (2) isoproterenol (0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Posteriormente cada subgrupo se dividió en 4 (n=6 cada uno); de los cuales el grupo control no recibió infusión (1); y el resto recibió una infusión i.v. continúa de: (2) PBS (Vehículo; 0.02 ml/min); (3) NaHS (310 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min); y (4) NaHS (560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min) durante 20 min. Inmediatamente después se realizó una segunda curva dosis-respuesta bajo las infusiones antes mencionadas. La infusión fue detenida una vez que se completó la segunda curva.

6.5.3 Determinación del efecto del NaHS sobre el tono no adrenérgico/no colinérgico

Se emplearon 48 animales que fueron descerebrados y desmedulados de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Después de dicho procedimiento, los animales fueron divididos en dos grupos para determinar las respuestas vasodepresoras inducidas por: (1) estimulación selectiva del tono sensorial NANC como se describió previamente (n=24); y (2) bolos i.v. de α -CGRP exógeno (n=24). Dichas respuestas fueron investigadas bajo diferentes condiciones experimentales.

El primer grupo se dividió en 4 subgrupos. El subgrupo (1) no recibió infusión; los demás subgrupos recibieron infusión i.v. continúa de: (2) vehículo (PBS 0.02 ml/min); (3) NaHS (10 μ g/kg min) y (4) NaHS (18 μ g/kg min). Diez min después del tratamiento anterior, se realizó una curva estímulo respuesta a las frecuencias de 0.56, 1, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz.

Asimismo, el segundo grupo se dividió en 4 subgrupos. El primer subgrupo no recibió infusión (1); y los subgrupos restantes recibieron infusión i.v. continúa de: (2) vehículo (0.02 ml/min); (3) NaHS (10 μ g/kg min) y (4) NaHS (18 μ g/kg min). 10 min después del tratamiento, los animales recibieron bolos i.v. de CGRP a las dosis de 0.31, 0.56, 1.0, 1.8 y 3.1 μ g/kg.

6.6 Análisis estadístico

6.6.1 Efecto sobre el tono simpático vasopresor y cardioacelerador

Todos los datos se presentan como la media \pm e.e.m. Los cambios máximos en la presión sanguínea en respuesta a la estimulación eléctrica, noradrenalina o metoxamina; así como los cambios máximos en la frecuencia cardiaca en respuesta a estimulación eléctrica, noradrenalina o isoproterenol fueron determinados: (1) antes de la infusión de vehículo o NaHS; y (2) durante la infusión de vehículo o NaHS. Las diferencias entre dichos cambios dentro de

cada subgrupo de animales fueron evaluadas por una prueba post-hoc de Tukey, una vez que el análisis de varianza de dos vías de medidas repetidas (Two-Way RM ANOVA) reveló diferencias entre las poblaciones. La significancia estadística se aceptó cuando $P < 0.05$.

6.6.2 Efecto sobre el tono sensorial no adrenérgico/no colinérgico

Todos los datos se presentan como la media \pm e.e.m. Los cambios en la presión sanguínea fueron determinados en respuesta a la estimulación eléctrica o a α -CGRP exógeno. Las diferencias de los cambios fueron comparadas en grupos independientes, teniendo como control el grupo que se estimuló sin infusión de vehículo o NaHS. Las diferencias entre los grupos se evaluaron por una prueba post-hoc de Tukey, una vez que el análisis de varianza de dos vías (Two-Way ANOVA) reveló diferencias entre las poblaciones. La significancia estadística se aceptó cuando $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del NaHS sobre el tono vasopresor

7.1.1 Efecto del NaHS sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación selectiva del tono simpático vasopresor

En la Fig. 14 se ilustran registros originales que muestran el efecto de la estimulación eléctrica del tono simpático vasopresor en ausencia (Fig. 14A) o presencia de NaHS (Fig. 14B y 14C). Nótese que la administración de NaHS inhibió los incrementos de presión arterial inducidos por la estimulación del tono simpático vasopresor.

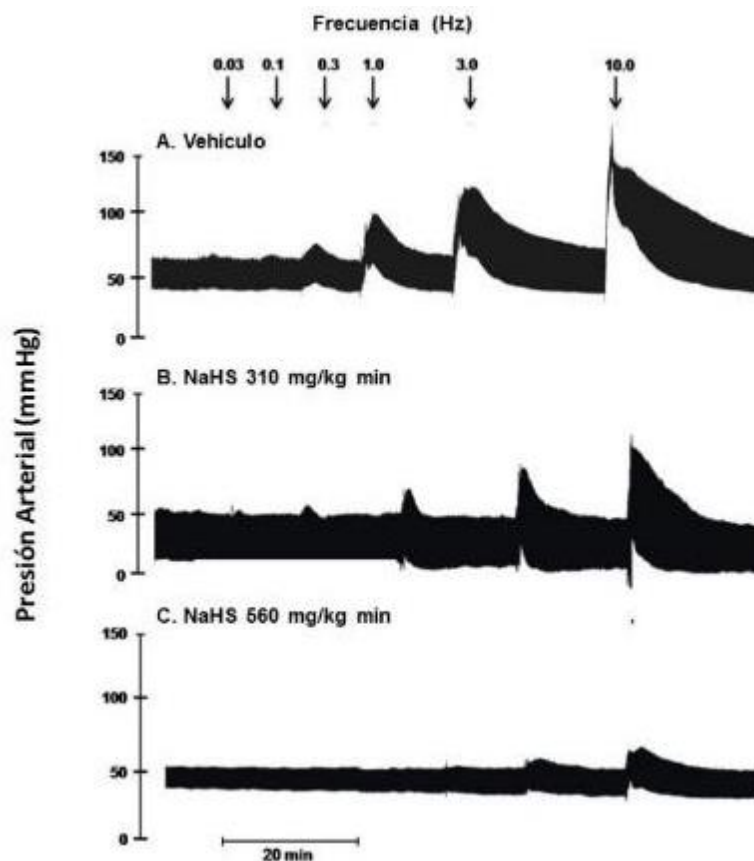


Fig. 14 Registros originales que muestran el efecto del (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); y la disminución de las respuestas presoras inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático vasopresor en presencia de una infusión continua de: (B) 310 μ g/kg min NaHS; y (C) 560 μ g/kg min NaHS.

Como se muestra en la Fig. 15, la estimulación eléctrica indujo respuestas vasopresoras dependientes de la frecuencia de estimulación. Dichas respuestas no cambiaron significativamente en presencia del vehículo del NaHS (Fig. 15A). Por lo contrario, la infusión continua de NaHS, a una dosis de 310 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min, produjo inhibición de las respuestas vasopresoras, particularmente a las frecuencias de 3 y 10 Hz (Fig. 15B). Además, el NaHS a 560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min inhibió significativamente las respuestas vasopresoras a las frecuencias de estimulación de 1, 3 y 10 Hz (Fig. 15C).

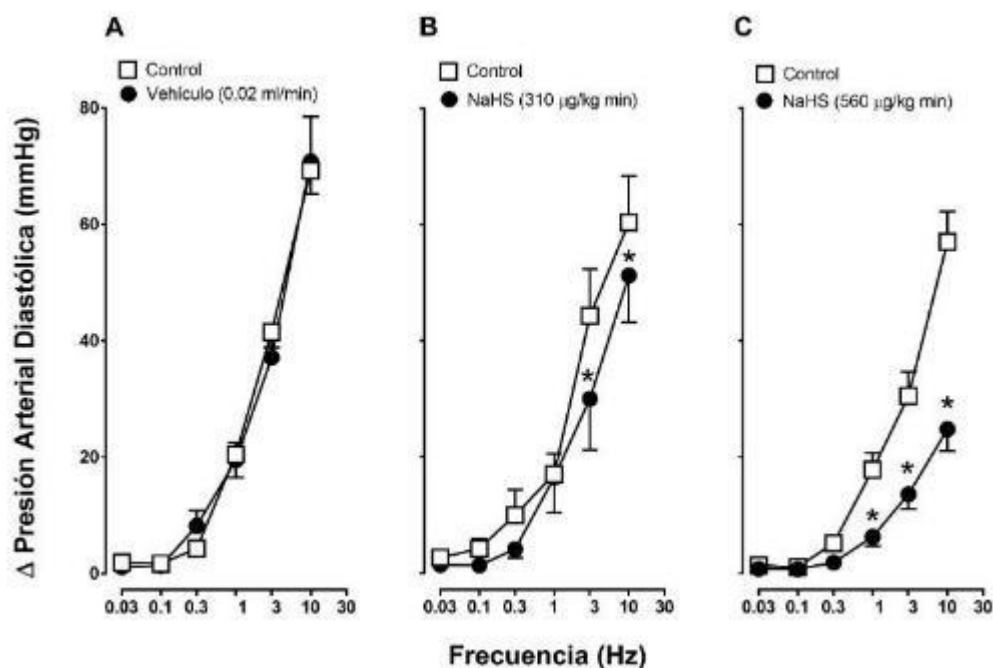


Fig. 15 Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 310 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min; o (C) NaHS 560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático vasopresor (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 Hz). Se observa una disminución de las respuestas en los paneles (B) y (C) a las frecuencias de 3 y 10 Hz y 1, 3 y 10 Hz, respectivamente. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs control.

Por tanto, es posible que el H_2S se encuentre inhibiendo el tono simpático vasopresor o interactuando con receptores α -adrenérgicos a nivel post-unional. Para descartar la segunda opción, se realizaron curvas dosis respuesta con agonistas α -adrenérgicos (noradrenalina y metoxamina).

7.1.2 Efecto del NaHS sobre las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina y metoxamina.

Las Figs. 16 y 18 muestran que la administración i.v. de noradrenalina y metoxamina, respectivamente, produjeron respuestas vasopresoras que no fueron inhibidas por la infusión del vehículo. Las respuestas vasopresoras a noradrenalina fueron aumentadas significativamente a las dosis de 0.03, 0.3 y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la gráfica de vehículo (Fig. 16A); sin embargo, cuando se determinó el área bajo la curva no se observó el mencionado efecto (Fig. 17). Además, la infusión continua de NaHS, a las dosis de 310 y 560 $\mu\text{g}/\text{kg min}$, no disminuyó las respuestas vasopresoras inducidas por la administración de noradrenalina exógena (Fig. 16B y 16C). De hecho, dichas respuestas fueron significativamente aumentadas por 310 $\mu\text{g}/\text{kg min}$ de NaHS a las dosis de 0.03-1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de noradrenalina (Fig. 16B), lo cual no se observó cuando se determinó el área bajo la curva (Fig. 17). Por otra parte, las respuestas vasopresoras inducidas por metoxamina permanecieron sin cambios significativos en presencia de vehículo o de la infusión de NaHS a 310 y 560 $\mu\text{g}/\text{kg min}$ (Fig. 18A, 18B y 18C; respectivamente).

Con lo anterior, se descarta una interacción del H_2S con los receptores α -adrenérgicos localizados en los vasos sanguíneos, ya que las respuestas inducidas por los agonistas α -adrenérgicos permanecieron sin cambios significativos. Por tanto, se puede concluir que el sulfuro de hidrógeno es capaz de inhibir el tono simpático vasopresor

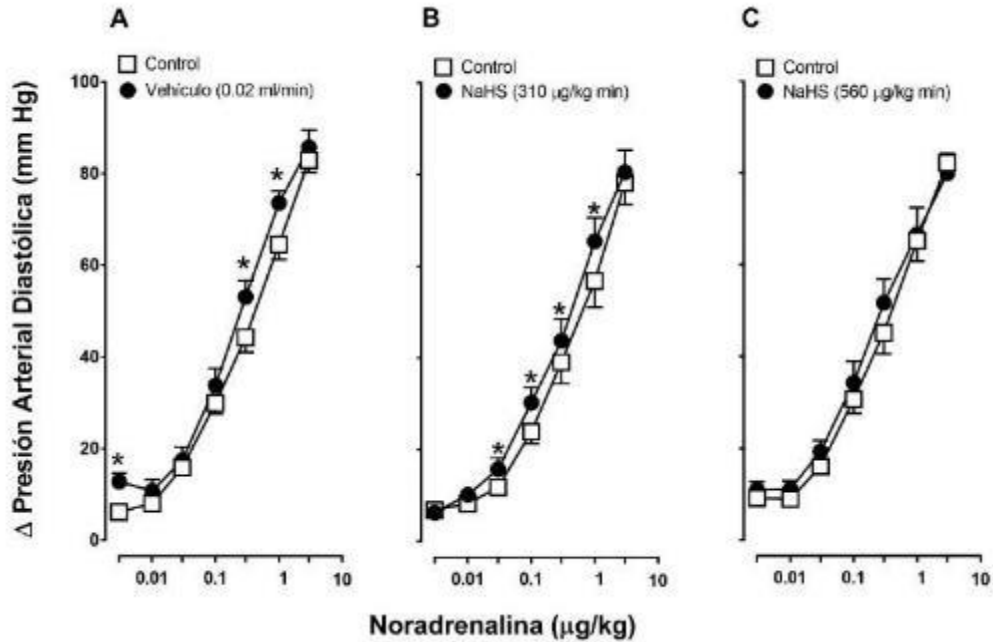


Fig. 16 Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 310 $\mu\text{g/kg min}$; o (C) NaHS 560 $\mu\text{g/kg min}$ sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático vasopresor (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 $\mu\text{g/kg}$). Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs control.

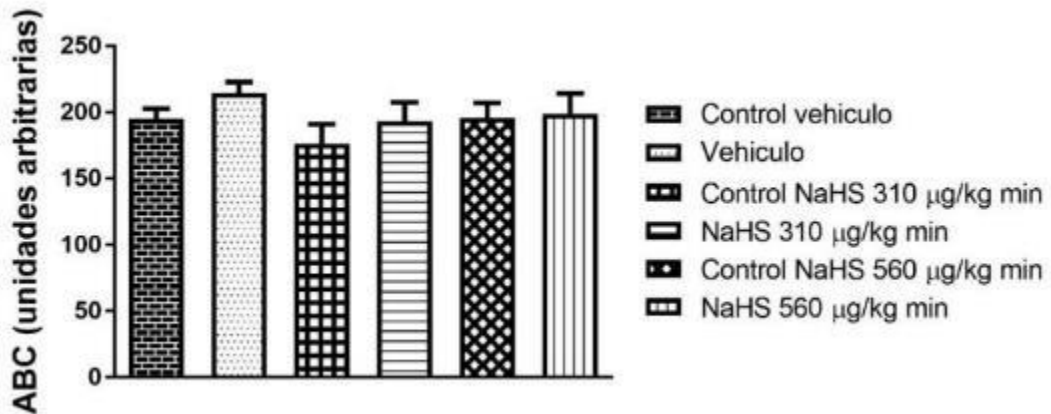


Fig. 17 Área bajo la curva del efecto de NaHS, o su vehículo, sobre las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Ninguno de los valores obtenidos fue diferente a su respectivo control.

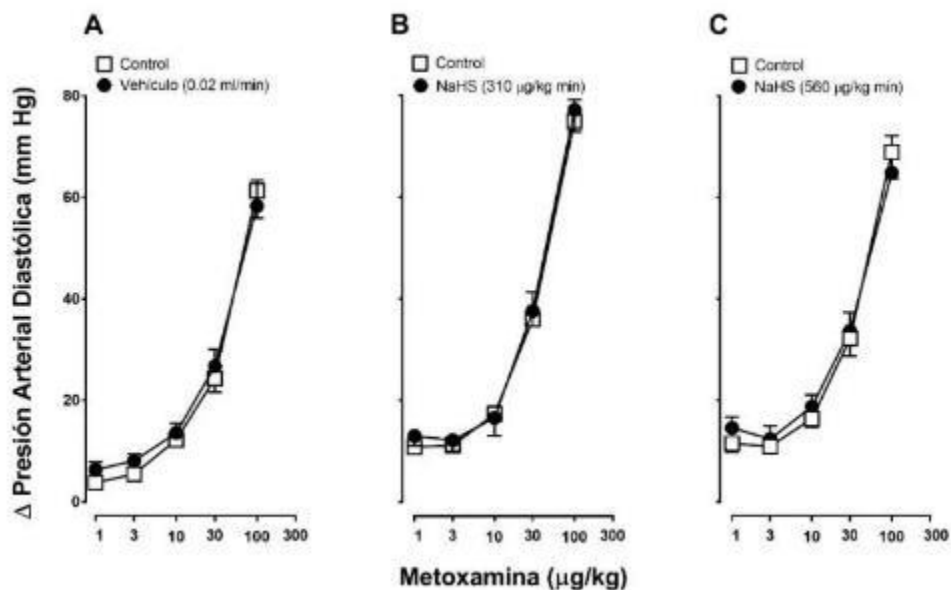


Fig. 18 Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 310 $\mu\text{g/kg min}$; o (C) NaHS 560 $\mu\text{g/kg min}$ sobre las respuestas vasopresoras inducidas por administración de metoprolol (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu\text{g/kg}$). Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales.

7.2 Efecto del NaHS sobre el tono simpático cardioacelerador

7.2.1 Efecto del NaHS sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación selectiva del tono simpático vasopresor

La Fig. 19 muestra los registros originales del efecto de la estimulación eléctrica del tono simpático cardioacelerador en ausencia (Fig. 19A) o presencia de NaHS (Fig. 19B y 19C). Se puede observar que la administración de NaHS inhibió las respuestas taquicárdicas inducidas por la estimulación del tono simpático cardioacelerador.

En la Fig. 20 se observa que la estimulación eléctrica indujo respuestas taquicárdicas dependientes de la frecuencia de estimulación. Dichas respuestas fueron altamente reproducibles ya que no se observan cambios significativos cuando se repite una segunda curva (Fig. 20A). Además, el vehículo no modificó significativamente las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica (Fig. 20B). De manera interesante, la infusión

continua de 310 $\mu\text{g}/\text{kg min}$ de NaHS indujo una disminución estadísticamente significativa a la frecuencia de 3.2 Hz (Fig. 20C); mientras que a la dosis de 560 $\mu\text{g}/\text{kg min}$ de NaHS disminuyó significativamente las respuestas taquicárdicas inducidas por las frecuencias de 1.6 y 3.2 Hz (Fig. 20D).

Con base en estos resultados, es posible concluir que el H₂S tiene la capacidad de inhibir el tono simpático cardioacelerador. Hasta este punto no es posible descartar una interacción con los receptores β -adrenérgicos por lo que se evaluó el efecto sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por noradrenalina e isoproterenol (agonistas β -adrenérgicos).

7.2.2 Efecto del NaHS sobre las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina e isoproterenol

La Fig. 21 muestra que la administración i.v. de noradrenalina indujo respuestas taquicárdicas dependientes de la dosis, las cuales fueron reproducibles en una segunda curva (Fig. 21A). Asimismo, la administración i.v. de isoproterenol produjo respuestas taquicárdicas dependientes de la dosis (Fig. 22); sin embargo, al realizar una segunda curva se observó taquifilaxis (Fig. 22A). Por tal motivo, las respuestas a isoproterenol fueron determinadas en grupos independientes pretratados con PBS o NaHS. Bajo esas condiciones, las respuestas taquicárdicas inducidas por noradrenalina (Fig. 21B) o isoproterenol (Fig. 22B) no fueron inhibidas significativamente por la infusión del vehículo. Además, la infusión continua de NaHS a las dosis de 310 y 560 $\mu\text{g}/\text{kg min}$ no produjo cambios significativos en las respuestas taquicárdicas inducidas por noradrenalina (Figs. 21C y 21D, respectivamente) o isoproterenol (Figs. 22C y 22D, respectivamente).

Con tales resultados, es posible concluir que el H₂S no interactúa con receptores β -adrenérgicos y es capaz de inhibir el tono simpático cardioacelerador.

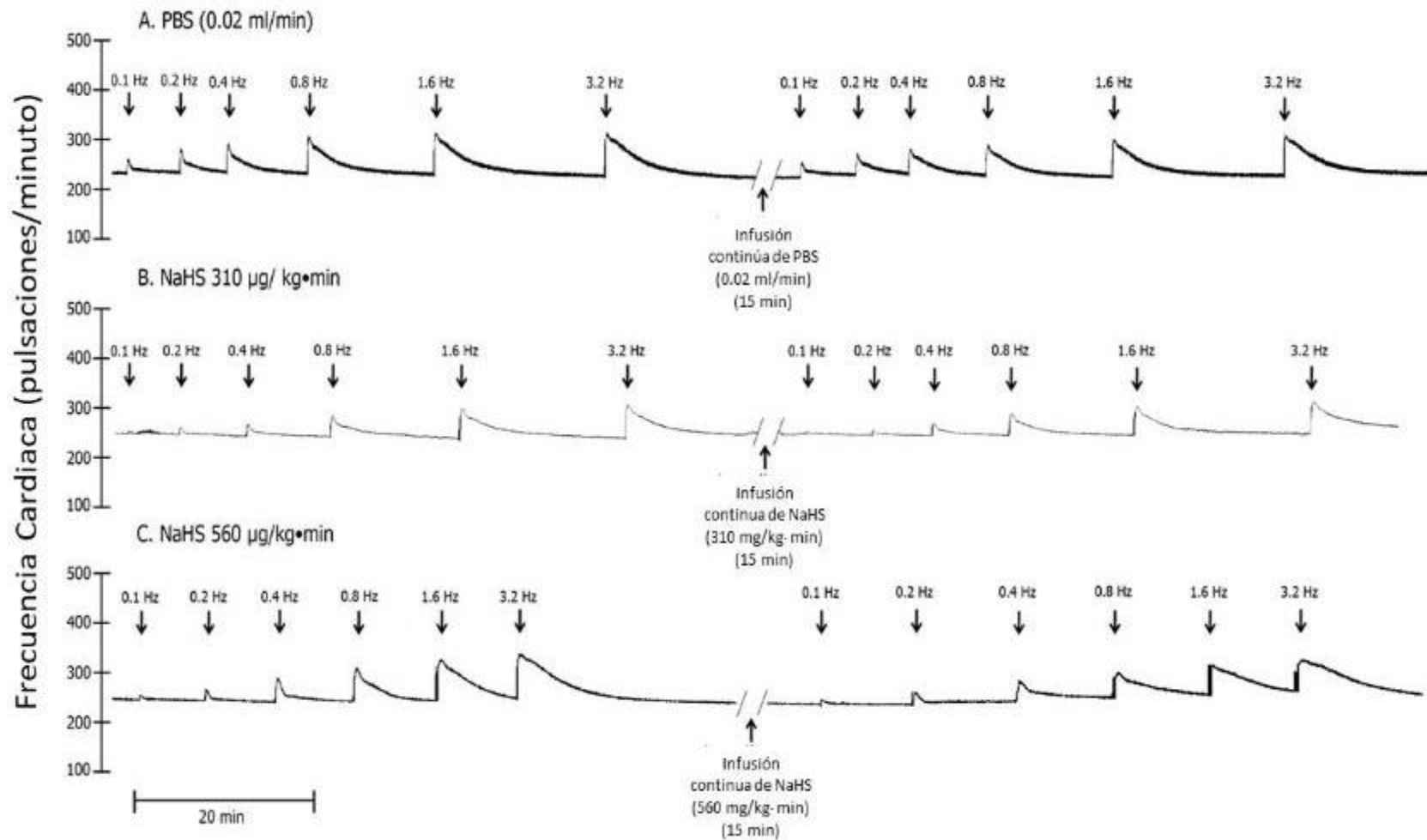


Fig. 19 Registros originales que muestran: (1) el efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min) sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático cardioacelerador a las frecuencias de 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 3.2 Hz antes (primera curva estímulo-respuesta) y durante (segunda curva estímulo-respuesta); y (2) la disminución inducida por la infusión continua de: (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) 310 µg/kg min de NaHS; y (C) 560 µg/kg min de NaHS.

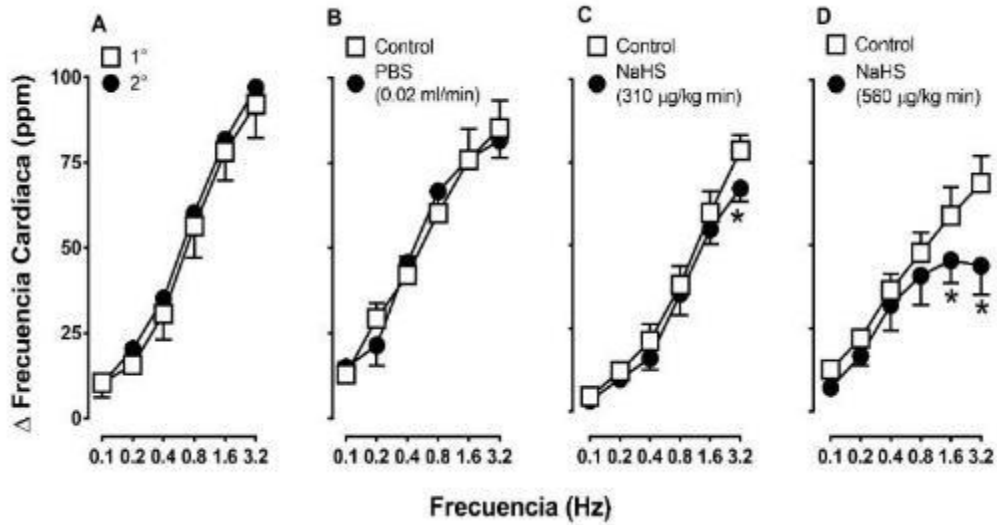


Fig. 20 Curva de reproducibilidad (A) y efecto de: (B) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (C) NaHS 310 $\mu\text{g}/\text{kg min}$; o (D) NaHS 560 $\mu\text{g}/\text{kg min}$ sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático cardioacelerador (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 Hz). Nótese la disminución de las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica en los paneles (C) y (D). Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs control.

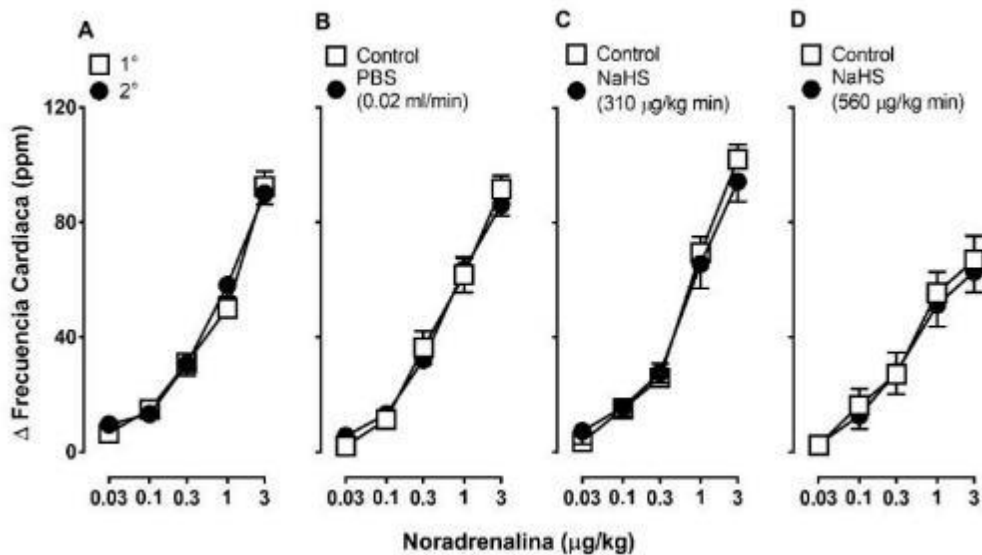


Fig. 21 Curva de reproducibilidad (A) y efecto de: (B) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (C) NaHS 310 $\mu\text{g}/\text{kg min}$; o (D) NaHS 560 $\mu\text{g}/\text{kg min}$ sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por la administración de noradrenalina (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales.

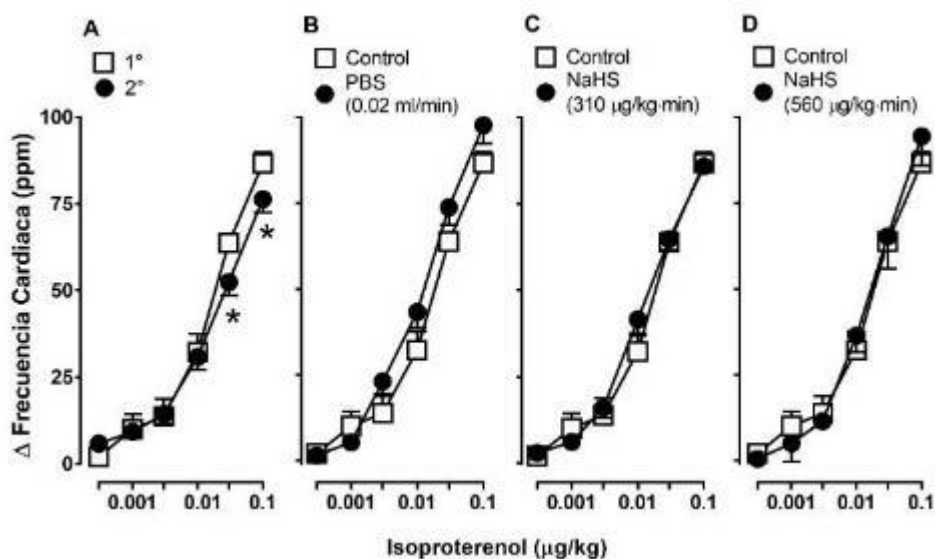


Fig. 22 Curva de reproducibilidad (A) y efecto de: (B) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (C) NaHS 310 $\mu\text{g}/\text{kg min}$; o (D) NaHS 560 $\mu\text{g}/\text{kg min}$ sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por la administración de isoproterenol (0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03 y 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs control.

7.3 Efecto del NaHS sobre el tono sensorial vasodepresor No adrenérgico/no colinérgico

7.3.1 Efecto del NaHS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación selectiva del tono sensorial no adrenérgico/no colinérgico

La Fig. 23 muestra registros originales de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial no adrenérgico/no colinérgico en ausencia (Fig. 23A) o presencia de NaHS (Fig. 23B y 23C). Se puede observar que la administración de NaHS induce un incremento de las respuestas vasodepresoras.

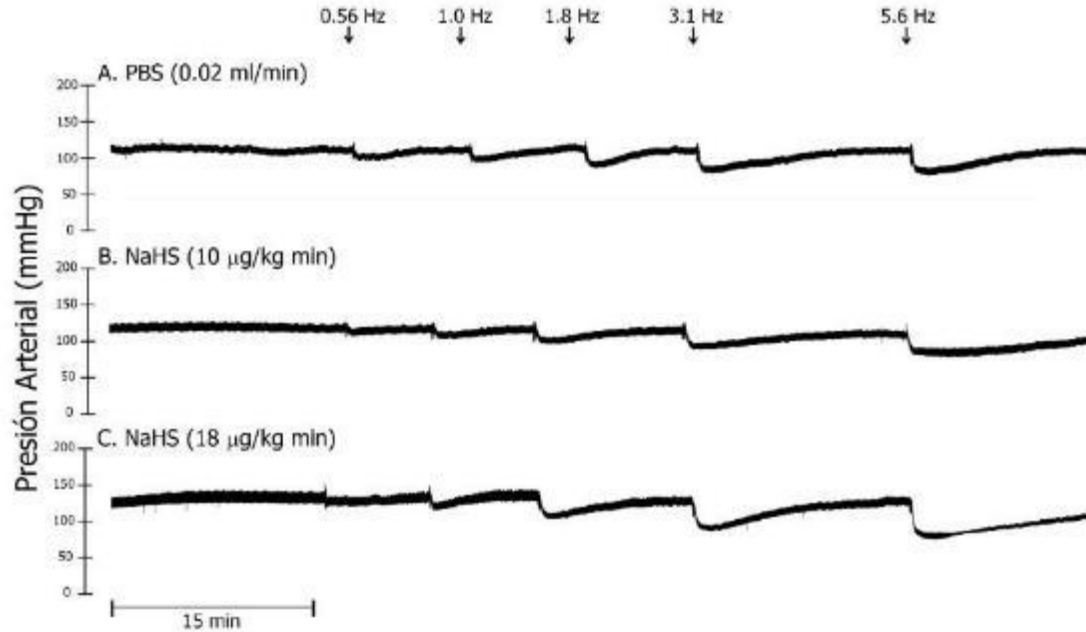


Fig. 23 Registros originales que muestran las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial no adrenérgico no colinérgico a las frecuencias de 0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz durante la infusión continua de: (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) 10 $\mu\text{g/kg min}$ de NaHS; y (C) 18 $\mu\text{g/kg min}$ de NaHS. Se nota un incremento en las respuestas vasodepresoras en los paneles (B) y (C).

Como se observa en la Fig. 24, la estimulación eléctrica del tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico indujo respuestas vasodepresoras estímulo-dependientes. Dichas respuestas vasodepresoras no se modificaron significativamente en presencia del vehículo (Fig. 24A). Por otra parte, la infusión continua de NaHS, a una dosis de 10 $\mu\text{g/kg min}$, produjo un incremento de la respuesta vasodepresora inducida por 5.6 Hz estadísticamente significativo (Fig. 24B). De manera interesante, el NaHS a 18 $\mu\text{g/kg min}$ aumentó significativamente las respuestas vasodepresoras a las frecuencias de estimulación de 1.8, 3.1 y 5.6 Hz (Fig. 24C).

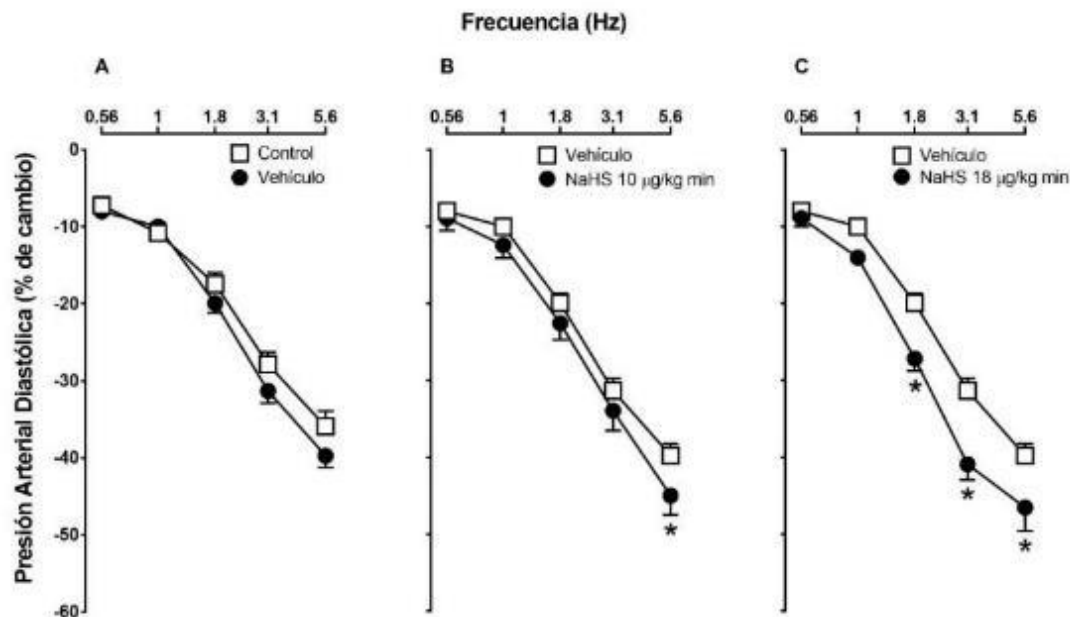


Fig. 24 Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 10 µg/kg min; o (C) NaHS 18 µg/kg min sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación selectiva del tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico (0.56, 1.0, 1.8, 3.1 y 5.6 Hz). Se aprecia que en los paneles (B) y (C) hay un incremento de la respuesta vasodepresora inducida por estimulación eléctrica. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs vehículo.

Por lo que, es posible que el H_2S incremente la liberación de CGRP y, por tanto, induzca un incremento de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico.

7.3.2 Efecto del NaHS sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por α -CGRP

Las Fig. 25 muestra que la administración i.v. de α -CGRP indujo respuestas vasodepresoras dependientes de la dosis (Fig. 25A). Las respuestas vasodepresoras inducidas por α -CGRP no fueron modificadas significativamente por la infusión del vehículo (Fig. 25A). Además, la infusión continua de NaHS a las dosis de 10 µg/kg min (Fig. 25B) y 18 (Fig. 25C) µg/kg min no produjo cambios significativos en las respuestas vasodepresoras comparadas con el vehículo.

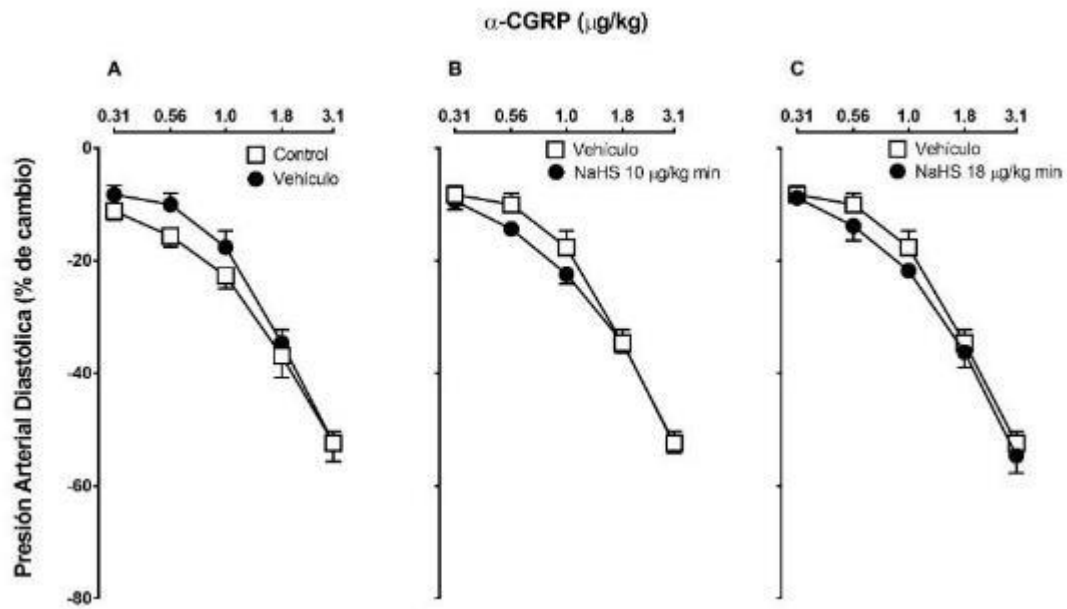


Fig. 25 Efecto de (A) vehículo (PBS; 0.02 ml/min); (B) NaHS 10 $\mu\text{g/kg min}$; o (C) NaHS 18 $\mu\text{g/kg min}$ sobre las respuestas vasodepressoras inducidas por administración exógena de α -CGRP (0.31, 0.56, 1.0, 1.8 y 3.1 $\mu\text{g/kg}$). Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales.

Con los resultados anterior, se puede descartar que el H_2S tenga una interacción directa con los receptores a CGRP. Sugiriendo que el aumento de las respuestas vasodepressoras se debe a un incremento en la liberación de CGRP.

8. DISCUSIÓN

Existen diversos estudios que han demostrado que el H₂S produce efectos de vasorrelajación dosis-dependiente en arterias aisladas incluyendo aorta de ratón (Al-Magableh y Hart, 2011); aorta de rata (Ali et al., 2006; Martelli et al., 2013; Zhao et al., 2001b); arterias mesentéricas de rata (d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2011; Jackson-Weaver et al., 2013); y arterias cerebrales de rata (Han et al., 2013; Streeter et al., 2012; Tian et al., 2012). Además en la rata anestesiada, el H₂S es capaz de inducir hipotensión y bradicardia (Li et al., 2008; Swan et al., 2017; Yoo et al., 2015; Zhao et al., 2001b). Muchos han sido los mecanismos propuestos para explicar tal fenómeno tales como: (1) la activación de canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) (Zhao et al., 2001b); (2) la inhibición de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) (Bucci et al., 2010); (3) la vía de la ciclooxigenasa y derivados del ácido araquidónico (d'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2011; Fernandes et al., 2013); la liberación de CGRP (Eberhardt et al., 2014; Hajna et al., 2016; White et al., 2013); entre otros. Sin embargo, la posible inhibición del tono simpático no había sido estudiada.

8.1 Efecto del NaHS sobre el tono simpático vasopresor

En el presente trabajo de investigación se demostró que el sulfhidrato de sodio (NaHS) es capaz de inhibir el tono simpático vasopresor, ya que el NaHS: (1) inhibe de manera dosis dependiente las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (Fig. 15); y (2) no inhibe las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina (Fig. 16) o metoxamina (Fig. 17).

De lo anterior, es posible que la infusión i.v. de NaHS pudiera estar bloqueando los receptores adrenérgicos α_1 y α_2 en el sistema cardiovascular. Sin embargo, se ha demostrado que la fentolamina, un antagonista no selectivo de los receptores α -adrenérgicos, no tiene un efecto significativo sobre la hipotensión inducida por la administración i.v. de NaHS en el modelo de rata anestesiada (Yoo et al., 2015). Además, en el presente trabajo la infusión continua de NaHS

no bloqueó las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina (Fig. 16) o metoxamina (Fig. 17). Por lo anterior, se puede inferir que el NaHS no tiene efecto sobre los receptores adrenérgicos α .

Adicionalmente, no se puede excluir que el NaHS se encuentre interactuando con los receptores β -adrenérgicos, como se ha demostrado previamente en miocitos ventriculares aislado (Yong et al., 2008). Dicho bloqueo puede inducir una disminución del gasto cardíaco induciendo un decremento en la presión arterial. Sin embargo, se ha demostrado que la hipotensión y bradicardia inducida por H_2S son fenómenos que se presentan de forma independiente (Swan et al., 2017). A pesar de lo anterior, es importante destacar que la modulación del tono vascular está determinada predominantemente por receptores adrenérgicos α_1 que inducen incrementos de la presión arterial (Docherty, 2011). En menor medida por receptores β -adrenérgicos que, por su mecanismo transduccional, inducen respuestas de relajación (Tarizzo y Dahlöf, 1989). Además, como se detalla más adelante, nuestros datos sugieren que el NaHS no tiene efectos sobre los receptores β -adrenérgicos.

Por otra parte, es posible argumentar que la inhibición de las respuestas vasopresoras inducida por NaHS se deba a procesos de desensibilización o taquifilaxis. Sin embargo, esta posibilidad se puede descartar porque las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica preganglionar del tono simpático no se modificaron en presencia de vehículo (Fig. 15).

Diversos estudios han demostrado que el NaHS tiene la capacidad de inhibir el tono simpático en los cuerpos ciliares del iris de bovino (Kulkarni et al., 2009) así como en la uvea anterior de bovino (Salvi et al., 2016). Se ha reportado que el H_2S induce un incremento en la liberación de neurotransmisores en la unión neuromuscular en ranas (Gerasimova et al., 2015). Además, el H_2S potencia la transmisión colinérgica excitatoria provenientes de los nervios espláncnicos en ganglios mesentéricos superiores de ratón inhibiendo la

motilidad colónica (Sha et al., 2013). Asimismo, el H₂S inhibe la endocitosis de vesículas sinápticas en las terminaciones nerviosas motoras del diafragma (Mitrukhina et al., 2013). Recientemente, se reportó que el NaHS es capaz de inhibir las corrientes de Ca²⁺ en células cromafines adrenales de bovino. Facilita la secreción de catecolaminas de dichas células por modificaciones en el manejo de Ca²⁺ intracelular (Ricardo de Pascual et al., 2018).

Con base en las evidencias anteriormente descritas y los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede sugerir que el H₂S es capaz de modular la liberación de neurotransmisores de las terminales simpáticas, como lo hace en las neuronas de hipocampo donde se demostró por primera vez (Abe and Kimura, 1996).

Con respecto al efecto del NaHS sobre las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina, se observó que dichas respuestas fueron significativamente mayores bajo la infusión de vehículo y de la dosis de 310 µg/kg min (Fig. 16). Sin embargo, al calcular el área bajo la curva de dichas respuestas, el aumento de las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina no fue significativo (Fig. 17). Aunque no se tiene una explicación clara de este hecho, se sugiere que puede deberse a una hipersensibilización transitoria a la noradrenalina.

A pesar de que en el presente proyecto de investigación no se estudiaron los mecanismos que subyacen a la inhibición del tono simpático, se puede sugerir que estos mecanismos pudieran involucrar: 1) la sulfhidración de proteínas (Paul y Snyder, 2015a); y 2) la sulfatación de los complejos mitocondriales o la generación de polisulfuros, como previamente se ha propuesto (Meng et al., 2018).

8.2 Efecto del NaHS sobre el tono simpático cardioacelerador

Las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación selectiva del tono simpático cardioacelerador estuvieron acompañadas de incrementos no significativos de la presión sanguínea. Por otra parte, la administración i.v. de noradrenalina indujo respuestas taquicárdicas acompañadas de respuestas vasopresoras debidas a la activación de los receptores α_1 y α_2 adrenérgicos localizados en la vasculatura sistémica.

Se ha observado la expresión de receptores α -adrenérgicos en el corazón. Dichos receptores pueden ser activados por noradrenalina (Woodcock, 2007). Por tanto, se decidió utilizar el isoproterenol, un agonista β -selectivo, en el presente trabajo de investigación. Los bolos i.v. de isoproterenol, aparte de las respuestas taquicárdicas, indujeron respuestas vasodepresoras. Ambas respuestas son mediadas por activación de receptores β -adrenérgicos en el corazón y los vasos sanguíneos, respectivamente (Guimarães y Moura, 2001).

Es importante resaltar que las respuestas taquicárdicas inducidas por isoproterenol no fueron reproducibles al realizar una segunda curva dosis-respuesta en un mismo animal (Fig. 22). Lo anterior puede deberse a procesos de desensibilización o taquifilaxis. Dicho fenómeno ha sido previamente descrito en corazón aislado de rata y se ha sugerido que puede deberse a mecanismo dependiente de adenilato ciclasa (McMartin y Summers, 1999). Dentro de tales mecanismos se encuentra el desacople del receptor y la proteína G inducido por el incremento en los niveles de AMPc y la subsecuente activación de la cinasa A de proteínas (PKA) (Hausdorff et al., 1990). Por esta razón, el efecto del vehículo o NaHS sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por isoproterenol fueron determinadas en grupos independientes.

Se ha observado que, en neuronas del sistema nervioso simpático, los donadores de H₂S tal como el NaHS ejercen efectos duales sobre la liberación

de noradrenalina. En neuronas aisladas, el H₂S facilita la liberación de neurotransmisores a nivel de la unión neuroefectora. Mientras que, a nivel de neuronas ganglionares este gasotransmisor induce hiperpolarización (Dominguez-Rodriguez et al., 2017). Asimismo, el NaHS es capaz de atenuar, de manera dosis dependiente, la actividad de los nervios simpáticos renales (Guo et al., 2016).

En su conjunto, nuestros resultados demuestran que el H₂S es capaz de inhibir el tono simpático cardioacelerador, así como al vasopresor, ya que la administración de NaHS inhibe de manera dosis-dependiente las respuestas taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica (Fig. 20). Además, la infusión de las diferentes dosis de NaHS no modificó de manera significativa la taquicardia inducida por bolos i.v. de noradrenalina (Fig. 21) o isoproterenol (Fig. 22).

Por otro lado, estudios previos han demostrado que el H₂S inhibe la contractilidad inducida con isoproterenol en miocitos cardiacos (Yong et al., 2008). Sin embargo, el propranolol no fue capaz de bloquear la bradicardia inducida por NaHS en el modelo de rata anestesiada (Yoo et al., 2015). Además, como se mencionó previamente, las respuestas taquicárdicas inducidas por noradrenalina o isoproterenol no se modificaron en presencia de NaHS. Lo anterior sugiere que, bajo nuestras condiciones experimentales, el NaHS no bloqueó a los receptores β -adrenérgicos que median la taquicardia.

En cuanto a los posibles mecanismos involucrados en la simpato-inhibición inducida por el H₂S, adicional a los anteriormente descritos, se ha propuesto la activación de canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}) localizados en las neuronas simpáticas (Dominguez-Rodriguez et al., 2017; Salvi et al., 2016).

8.3 Efecto del NaHS sobre el tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico

La estimulación selectiva del tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico, así como la administración de bolos i.v. de α -CGRP, inducen respuestas vasodepresoras de manera dependientes de la frecuencia (Taguchi et al., 1992) y de manera dependiente de la dosis (Avilés-Rosas et al., 2017), respectivamente. Dichas respuestas no fueron acompañados por cambios significativos sobre la frecuencia cardíaca, como se ha observado previamente (Avilés-Rosas et al., 2017).

Las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica no se modificaron significativamente en presencia de una infusión continua de vehículo. Por otra parte, la infusión de 10 y 18 μ g/kg min de NaHS incrementó de manera significativa dichas respuestas vasodepresoras a las frecuencias de 5.6 Hz y 1.8, 3.1 y 5.6 Hz, respectivamente. Dichos resultados, sugieren que el H₂S es capaz de incrementar la transmisión no adrenérgica/no colinérgica.

Acorde con nuestros resultados, se ha demostrado que la aplicación de Na₂S y NaHS en anillos de arterias mesentéricas induce vasorrelajación que se bloquea con la administración de CGRP₈₋₃₇, un fragmento de CGRP no activo que es antagonista del receptor a CGRP. Además, el efecto relajante se elimina también con la depleción de CGRP inducida por el tratamiento de capsaicina (Eberhardt et al., 2014; White et al., 2013).

De la misma manera, el NaHS induce un aumento del flujo sanguíneo cutáneo en la oreja de conejo que es inhibido por el pre-tratamiento con: 1) BIBN4096 (antagonista del receptor a CGRP); 2) resiniferatoxina (un agonista de los TRPA1); y 3) glibenclamida (un bloqueador de los canales K_{ATP}) (Hajna et al., 2016). En animales *knock out* (KO) para α -CGRP, NK1 y TRPA1 no se observó dicho aumento del flujo sanguíneo (Hajna et al., 2016).

Además, la estimulación eléctrica y la aplicación de GYY4137, un donador orgánico lento de H₂S, induce relajación en el músculo del cuello de la vejiga (Fernandes et al., 2013) y el uréter intravesical (Fernandes et al., 2014) de cerdo. Lo anterior, en presencia de guanetidina, un antagonista de los receptores α -adrenérgicos, y de atropina, un bloqueador de los receptores muscarínicos. Por otra parte, la aplicación de DL-propargilglicina, un inhibidor de la CSE, inhibe la relajación inducida por la estimulación eléctrica (Fernandes et al., 2014).

Si bien es cierto que en el presente trabajo no se evaluaron aquellos mecanismos que involucran al NO, se ha propuesto una interacción entre ambos gasotransmisores. En ese sentido, se ha propuesto que el H₂S y el NO reaccionan entre sí para formar un intermediario denominado nitroxilo (HNO) (Eberhardt et al., 2014; Teicher et al., 2017), el cual incrementa los niveles plasmáticos de CGRP (Eberhardt et al., 2014; Paolucci et al., 2003). Además, en ratones KO para la enzima CSE hay un incremento de la biodisponibilidad de NO y una disminución del HNO, que se restaura con la aplicación de NaHS. Por lo que se sugiere que el H₂S es capaz de regular los niveles endógenos de NO (Szijártó et al., 2018).

Se ha demostrado ampliamente que la relajación inducida por donadores de H₂S es inhibida con: 1) la aplicación de capsazepina antagonistas del canal TRPV1; 2) PACAP₆₋₃₈ antagonista del receptor a PACAP; 3) CGRP₈₋₃₇ antagonista del receptor a CGRP; y 4) HC030031, antagonista del canal TRPA1. Dicha relajación no se modifica significativamente en presencia de L-NAME, un inhibidor de la eNOS (Fernandes et al., 2013, 2014; White et al., 2013). Sin embargo, en anillos mesentéricos de rata, la relajación inducida por Na₂S se bloquea con L-NMMA, un inhibidor de la eNOS (Eberhardt et al., 2014) y permanece sin cambios con la administración de capsazepina (White et al., 2013). En razón de lo expuesto, el L-NAME no tiene efecto sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación selectiva del tono

sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico o administración i.v. de α -CGRP (Yamawaki et al., 2017).

Los mecanismos que subyacen al aumento de la liberación de CGRP no fueron estudiados en el presente trabajo. Sin embargo, con base en las evidencias anteriormente descritas, se puede especular que el H₂S es capaz de activar de manera independiente, o en conjunto con el NO, al canal TRPA1 ya que es una proteína rica en cisteínas (Eberhardt et al., 2014). La activación de dicho canal está determinada por los residuos Cis⁶²¹, Cis⁶⁴¹ y Cis⁶⁶⁵ del N-terminal, los cuales son susceptibles a reacciones de sulfhidración (Paul y Snyder, 2015a). Así mismo, la administración de NaHS y el Na₂S promueve el aumento de calcio intracelular en cultivos de neuronas del ganglio trigeminal, mismo que se inhibe en aquellas que no expresan el canal TRPA1 (Hajna et al., 2016).

Adicionalmente, en los trabajos anteriormente descritos se han propuesto otros mecanismos como: 1) los canales K_{ATP}, ya que la aplicación de glibenclamida bloquea la relajación inducida por H₂S sobre el músculo del cuello de la vejiga (Fernandes et al., 2013); y 2) aumento del flujo sanguíneo cutáneo (Hajna et al., 2016). La glibenclamida no es capaz de bloquear la vasodilatación inducida por NaHS en arterias mesentéricas de rata (White et al., 2013). La vía de la ciclooxigenasa-1 pudiera estar involucrada ya que la inhibición de dicha vía disminuye la relajación inducida por GYY4137 (Fernandes et al., 2013). Es importante mencionar que las respuestas vasodepresoras pueden estar mediadas tanto por CGRP como por Sustancia P (Hajna et al., 2016).

Nuestros resultados sugieren que el H₂S es capaz de promover la liberación de CGRP cuando se estimula selectivamente el tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico, pero no cuando se administran bolos i.v. de α -

CGRP, lo cual indicaría un efecto a nivel de la neurona sensorial y no sobre los receptores a CGRP localizados en los vasos sanguíneos.

Es importante destacar que las dosis empleadas en la evaluación del efecto sobre el tono simpático son mayores que las utilizadas para el tono sensorial vasodepresor. En estudios previos realizados en el laboratorio se observó que dosis menores a 310 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min no tenían un efecto significativo sobre las respuestas vasopresoras o taquicárdicas inducidas por estimulación eléctrica. Además, para evaluar las respuestas vasodepresoras es necesario utilizar herramientas farmacológicas que nos ayuden a incrementar la presión sanguínea, tal como la metoxamina. Como ya se mencionó anteriormente, el H_2S es capaz de inducir respuestas vasorelajantes por sí mismo. Al administrar dosis mayores a 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min se observó una disminución continua en la presión sanguínea. Dicha disminución enmascaraba las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación selectiva del tono sensorial vasodepresor o la administración i.v. de α -CGRP.

8.4 Relación del H_2S con la hipertensión

La hipertensión es una condición médica crónica en la que la presión sanguínea se encuentra elevada por arriba de 140/90 mm Hg (sistólica/diastólica). La hipertensión es el resultado de interacciones complejas de factores vasoactivos con varios tipos de células en las paredes de los vasos sanguíneos.

Se ha demostrado que distintos donadores de H_2S tienen la capacidad de inducir respuestas bradicárdicas e hipotensoras (Li et al., 2008; Swan et al., 2017; Yoo et al., 2015). Además, en ratones KO para la cistationin- γ -liasa, se ha observado una marcada hipertensión y una disminución en las respuestas relajantes dependientes de endotelio. Lo anterior sugiere un papel fisiológico importante del sulfuro de hidrógeno en la regulación del tono vascular y la presión arterial.

Asimismo, en un modelo de hipertensión inducido por administración de L-NAME y en ratas SHR, la administración tanto de NaHS como de GYY4137 inducen una disminución en la presión arterial, sugiriendo un potencial efecto terapéutico del H₂S sobre la hipertensión (Li et al., 2008).

Recientemente, en nuestro equipo de trabajo, encontramos que la administración de 5.6 mg/kg NaHS revierte las alteraciones cardiovasculares inducidas por una dieta rica en grasas; teniendo que, se produce una disminución en el tono simpático vasopresor (Gomez, 2018). Además, se ha observado que en animales con resistencia a la insulina, inducida por fructosa, existe una disminución de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono sensorial perivascular no adrenérgico/no colinérgico (Takatori et al., 2006).

Se ha sugerido que el control autonómico del sistema cardiovascular esta alterado durante la hipertensión, llevando a un incremento en la actividad del tono simpático y una disminución del tono parasimpático en vasos sanguíneos y corazón (Grassi y Ram, 2016). Por lo tanto, hay un incremento en la liberación de noradrenalina y de las respuestas taquicárdicas y vasopresoras. Además, la disfunción autonómica depende de una gran variedad de mecanismos y participa en el desarrollo y la progresión de la hipertensión (DiBona, 2013; Grassi et al., 2015; Guyenet, 2006).

En nuestros resultados observamos que la infusión de H₂S induce un incremento en las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación sin modificar aquellas inducidas por α -CGRP. Además, se observó una inhibición de tono simpático cardioacelerador y vasopresor. Por tanto, se puede sugerir que el H₂S tiene un efecto sobre la regulación del tono vascular.

Hasta la fecha existen distintas patologías en las que se ha evaluado el potencial efecto terapéutico de diversos donadores de H₂S. En ese sentido, existen estudios clínicos que han reportado efectos sobre distintas patologías:

(1) el SG-1002 (un donador de H₂S) sobre la insuficiencia cardiaca (Polhemus et al., 2015); (2) el Zofenopril (un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina y donador de H₂S) sobre la hipertensión (Napoli et al., 2004); y (3) ATB-346 (un donador de H₂S derivado de naproxeno) sobre los efectos adversos inducidos por el naproxeno (Wallace et al., 2018).

Por lo anterior, es posible utilizar donadores de H₂S para el tratamiento de patologías del sistema cardiovascular, tal como la hipertensión observada durante la obesidad u otras alteraciones metabólicas. El presente proyecto provee evidencia que contribuye al entendimiento del efecto antihipertensivo del H₂S.

9. CONCLUSIONES

9.1 El NaHS inhibe el tono simpático vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada a través de un mecanismo pre-unional ya que las respuestas a noradrenalina o metoxamina no fueron modificadas por el NaHS.

9.2 El NaHS inhibe el tono simpático cardioacelerador a través de un mecanismo pre-unional ya que las respuestas taquicárdicas a noradrenalina o isoproterenol no fueron inhibidas por el NaHS.

9.3 El NaHS incrementa la actividad del tono sensorial vasodepresor no adrenérgico/no colinérgico sin interactuar con los receptores a CGRP.

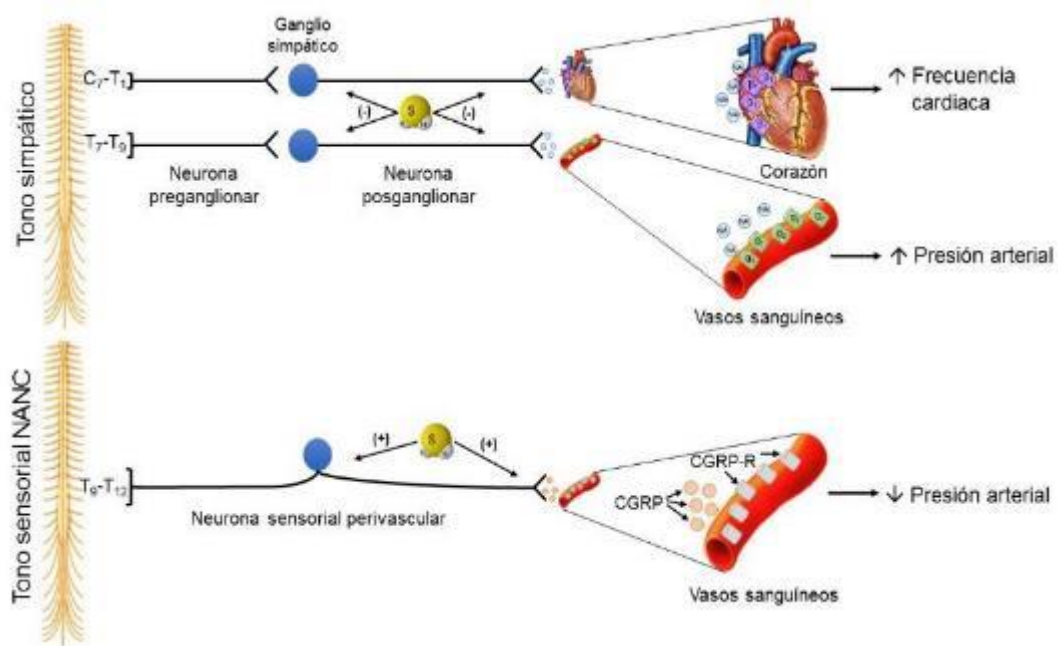


Fig. 26 Interacción del H₂S con el sistema nervioso simpático y no adrenérgico no colinérgico. El H₂S inhibe el tono simpático cardioacelerador y vasopresor. Además, estimula la liberación de CGRP de la neurona sensorial perivascular.

10. PERSPECTIVAS

- 10.1 Determinar si el efecto de inhibición del tono simpático ocurre a nivel de la neurona pre o post-ganglionar.
- 10.2 Evaluar la participación de canales iónicos como posibles mecanismos que subyacen a la inhibición del tono simpático, dentro de los que se encuentran el canal K_{ATP} , K_v , canales de Ca^{2+} o Na^+ ; así como las proteínas de adhesión de las vesículas y la membrana.
- 10.3 Cuantificar las concentraciones plasmáticas de noradrenalina en presencia y ausencia del donador de H_2S .
- 10.4 Utilizar herramientas farmacológicas que permitan determinar que las respuestas hipotensoras inducidas por el NaHS están mediadas por el tono sensorial no adrenérgica/no colinérgica.
- 10.5 Evaluar la participación de los canales TRPA1 y TRPV1 en el incremento de las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación sensorial perivascular.

11. REFERENCIAS

- Abe, K., y Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.*, 16(3), 1066–1071.
- Aburto, T. K., Lajoie, C., y Morgan, K. G. (1993). Mechanisms of signal transduction during alpha 2-adrenergic receptor-mediated contraction of vascular smooth muscle. *Circ. Res.*, 72(4), 778–785.
- Al-Magableh, M. R., y Hart, J. L. (2011). Mechanism of vasorelaxation and role of endogenous hydrogen sulfide production in mouse aorta. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 383(4), 403–413.
- Ali, M. Y., Ping, C. Y., Mok, Y.-Y., Ling, L., Whiteman, M., Bhatia, M., y Moore, P. K. (2006). Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br. J. Pharmacol.*, 149(6), 625–634.
- Amara, S. G., Arriza, J. L., Leff, S. E., Swanson, L. W., Evans, R. M., y Rosenfeld, M. G. (1985). Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science*, 229(4718), 1094–1097.
- Ammann, H. M. (1986). A new look at physiologic respiratory response to H₂S poisoning. *J. Hazard. Mater.*, 13(3), 369–374.
- Ando, K., Pegram, B. L., y Frohlich, E. D. (1990). Hemodynamic effects of calcitonin gene-related peptide in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, 258(2 Pt 2), R425-9.
- Avilés-Rosas, V. H., Rivera-Mancilla, E., Marichal-Cancino, B. A., Manrique-Maldonado, G., Altamirano-Espinoza, A. H., Maassen Van Den Brink, A., y Villalón, C. M. (2017). Olcegepant blocks neurogenic and non-neurogenic CGRPergic vasodepressor responses and facilitates noradrenergic vasopressor responses in pithed rats. *Br. J. Pharmacol.*, 174(13), 2001–2014.
- Beauchamp, R. O., Bus, J. S., Popp, J. A., Boreiko, C. J., Andjelkovich, D. A., y Leber, P. (1984). A Critical Review of the Literature on Hydrogen Sulfide Toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, 13(1), 25–97.

- Benavides, G. A., Squadrito, G. L., Mills, R. W., Patel, H. D., Isbell, T. S., Patel, R. P., ... Kraus, D. W. (2007). Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *104*(46), 17977–17982.
- Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L., Galli, R., Schols, D., De Clercq, E., ... Volterra, A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF α : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat. Neurosci.*, *4*(7), 702–710.
- Binkley, F., y Du Vigneaud, V. (1942). *The formation of cysteine from homocysteine and serine by liver tissue of rats. Journal of Biological Chemistry* (Vol. 144). American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- Böhme, G. A., Bon, C., Lemaire, M., Reibaud, M., Piot, O., Stutzmann, J. M., ... Blanchard, J. C. (1993). Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *90*(19), 9191–9194.
- Brain, S. D., y Grant, A. D. (2004). Vascular Actions of Calcitonin Gene-Related Peptide and Adrenomedullin. *Physiol. Rev.*, *84*(3), 903–934.
- Broadley, K. J. (1996a). Anatomy and physiology of the autonomic nervous system. In *Autonomic pharmacology* (pp. 2–36). Taylor y Francis.
- Broadley, K. J. (1996b). Non-adrenergic Non-cholinergic autonomic transmission. In *Autonomic pharmacology* (pp. 445–474). Taylor y Francis.
- Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C., ... Cirino, G. (2010). Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Inhibitor of Phosphodiesterase Activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, *30*(10), 1998–2004.
- Centurión, D., Cobos-Puc, L. E., Ramírez-Rosas, M. B., Gómez-Díaz, B., Sánchez-López, A., y Villalón, C. M. (2009). Pithed rat model for searching vasoactive drugs and studying the modulation of the sympathetic and non- adrenergic non-cholinergic outflow. In L. Rocha y V. Granados-Soto (Eds.), *Models in Neuropharmacology* (pp. 91–97). Kerala, India: Transworld Research Network.

- Chen, Y., Zhao, J., Du, J., Xu, G., Tang, C., y Geng, B. (2012). Hydrogen sulfide regulates cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake via KATP channel and PI3K/Akt pathway. *Life Sci.*, 91(7–8), 271–278.
- Chou, S., Ogden, J., Pohl, H., y Scinicariello, F. (2016). *Toxicological Profile for Hydrogen Sulfide and Carbonyl Sulfide*.
- Cooper, A. J. L. (1983). Biochemistry of Sulfur-Containing Amino Acids. *Annu. Rev. Biochem.*, 52(1), 187–222.
- Cotecchia, S. (2010). The α 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, 30(6), 410–419.
- d’Emmanuele di Villa
Bianca, R., Sorrentino, R., Coletta, C., Mitidieri, E., Rossi, A., Vellecco, V., ... Sorrentino, R. (2011). Hydrogen Sulfide-Induced Dual Vascular Effect Involves Arachidonic Acid Cascade in Rat Mesenteric Arterial Bed. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 337(1), 59–64.
- de Pascual, R., Baraibar, A. M., Méndez-López, I., Pérez-Ciria, M., Polo-Vaquero, I., Gandía, L., ... de Diego, A. M. G. (2018). Hydrogen sulphide facilitates exocytosis by regulating the handling of intracellular calcium by chromaffin cells. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.*
- DiBona, G. F. (2013). Sympathetic nervous system and hypertension. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, 61(3), 556–560.
- Docherty, J. R. (2011). Vasopressor nerve responses in the pithed rat, previously identified as α 2-adrenoceptor mediated, may be α 1D-adrenoceptor mediated. *Eur. J. Pharmacol.*, 658(2–3), 182–186.
- Dombkowski, R. A., Russell, M. J., y Olson, K. R. (2004). Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286(4), R678-85.
- Dominguez-Rodriguez, M., Drobny, H., Boehm, S., y Salzer, I. (2017). Electrophysiological Investigation of the Subcellular Fine Tuning of Sympathetic Neurons by Hydrogen Sulfide. *Front. Pharmacol.*, 8, 522.
- Du Vigneaud, V., Loring, H. S., y Craft, H. A. (1934). The oxidation of the sulfur

- of homocysteine, methionine and S-methylcysteine in the animal body. *J. Biocl. Chem.*, 105(June 1975), 481.
- Dupuytoren, M. (1806). Rapport sur une espèce de mephitisme des fosses d'aisance, produite par le gas azote. *J. Med.*, IX, 187–213.
- Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., ... Filipovic, M. R. (2014). H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat. Commun.*, 5, 4381.
- el Karib, A. O., Sheng, J., Betz, A. L., y Malvin, R. L. (1993). The central effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N omega-nitro-L-arginine) on blood pressure and plasma renin. *Clin. Exp. Hypertens.*, 15(5), 819–832.
- Evans, J. (2013). *Lo esencial en sistema cardiovascular*. Elsevier España.
- Fellin, T., Pascual, O., Gobbo, S., Pozzan, T., Haydon, P. G., y Carmignoto, G. (2004). Neuronal Synchrony Mediated by Astrocytic Glutamate through Activation of Extrasynaptic NMDA Receptors. *Neuron*, 43(5), 729–743.
- Felton, J. S. (1997). The heritage of Bernardino Ramazzini. *Occup. Med. (Lond)*., 47(3), 167–179.
- Fernandes, V. S., Ribeiro, A. S. F., Barahona, M. V., Orensanz, L. M., Martínez-Sáenz, A., Recio, P., ... Hernández, M. (2013). Hydrogen sulfide mediated inhibitory neurotransmission to the pig bladder neck: role of KATP channels, sensory nerves and calcium signaling. *J. Urol.*, 190(2), 746–756.
- Fernandes, V. S., Ribeiro, A. S. F., Martínez, P., López-Oliva, M. E., Barahona, M. V., Orensanz, L. M., ... Hernández, M. (2014). Hydrogen sulfide plays a key role in the inhibitory neurotransmission to the pig intravesical ureter. *PLoS One*, 9(11), e113580.
- Finkelstein, J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.*, 1(5), 228–237.
- Fitzgerald, R., DeSantiago, B., Lee, D. Y., Yang, G., Kim, J. Y., Brian Foster, D., ... An, S. S. (2014). H₂S relaxes isolated human airway smooth muscle cells via the sarcolemmal KATP channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,

- 446(1), 393–398.
- Förstemann,U. (2000). Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. In B. Mayer (Ed.), *Handbook of experimental pharmacology* (pp. 71–91). Springer, Berlin.
- Furne,J.,Saeed,A.,y Levitt,M. D. (2008). Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 295(5), R1479–R1485.
- Garthwaite,J.,Charles,S. L.,y Chess-Williams,R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336(6197), 385–388.
- Geng,B.,Yang,J.,Qi,Y.,Zhao,J.,Pang,Y.,Du,J.,y Tang,C. (2004). H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313(2), 362–368.
- Gerasimova,E.,Lebedeva,J.,Yakovlev,A.,Zefirov,A.,Giniatullin,R.,y Sitdikova,G. (2015). Mechanisms of hydrogen sulfide (H₂S) action on synaptic transmission at the mouse neuromuscular junction. *Neuroscience*, 303, 577–585.
- Gillespie,J. S.,MacLaren,A.,Marshall,R. W.,Muir,T. C.,y Pollock,D. (1970). Segmental stimulation of spinal autonomic outflows in the pithed cat and rat. *J. Physiol.*, 211(2), Suppl:11P+.
- Gillespie,J. S.,y Muir,T. C. (1967). A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 30(1), 78–87.
- Godo,S.,y Shimokawa,H. (2017). Endothelial Functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 37(9), e108–e114.
- Gomez,C. B. (2018). *Estudio de la modulación del sistema cistationina-y-liasa/sulfuro de hidrogeno sobre las alteraciones cardiovasculares y metabólicas inducidas por una dieta rica en grasas en la rata*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Goodwin,L. R.,Francom,D.,Dieken,F. P.,Taylor,J. D.,Warenycia,M. W.,Reiffenstein,R. J.,y Dowling,G. (1989). Determination of sulfide in

- brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J. Anal. Toxicol.*, 13(2), 105–109.
- Grassi,G.,Mark,A.,y Esler,M. (2015). The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. *Circ. Res.*, 116(6), 976–990.
- Grassi,G.,y Ram,V. S. (2016). Evidence for a critical role of the sympathetic nervous system in hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.*, 10(5), 457–466.
- Guide for Care and Use of Laboratory Animals.* (2017) (8th ed). Washington, DC.
- Guimarães,S.,y Moura,D. (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol. Rev.*, 53(2), 319–356.
- Guo,Q.,Wu,Y.,Xue,H.,Xiao,L.,Jin,S.,y Wang,R. (2016). Perfusion of isolated carotid sinus with hydrogen sulfide attenuated the renal sympathetic nerve activity in anesthetized male rats. *Physiol. Res.*, 65(3), 413–423.
- Guyenet,P. G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat. Rev. Neurosci.*, 7(5), 335–346.
- Hajna,Z.,Sághy,É.,Payrits,M.,Aubdool,A. A.,Szóke,É.,Pozsgai,G.,... Pintér,E. (2016). Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves Mediate the Cellular and Microvascular Effects of H₂S via TRPA1 Receptor Activation and Neuropeptide Release. *J. Mol. Neurosci.*, 60(2), 157–170.
- Han,J.,Chen,Z.-W.,y He,G.-W. (2013). Acetylcholine- and sodium hydrosulfide-induced endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization in cerebral vessels of global cerebral ischemia-reperfusion rat. *J. Pharmacol. Sci.*, 121(4), 318–326.
- Hausdorff,W. P.,Caron,M. G.,y Lefkowitz,R. J. (1990). Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J.*, 4(11), 2881–2889.
- Hölscher,C.,y Rose,S. P. (1992). An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. *Neurosci. Lett.*, 145(2), 165–167.
- Hosoki,R.,Matsuki,N.,y 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(3), 527–531.
- Ishigami, M., Hiraki, K., Umemura, K., Ogasawara, Y., Ishii, K., y Kimura, H. (2009). A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain. *Antioxid. Redox Signal.*, 11(2), 205–214.
- Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X.-N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., y Kimura, H. (2004). Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem. J.*, 381(Pt 1), 113–123.
- Jackson-Weaver, O., Osmond, J. M., Riddle, M. A., Naik, J. S., Gonzalez Bosc, L. V., Walker, B. R., y Kanagy, N. L. (2013). Hydrogen sulfide dilates rat mesenteric arteries by activating endothelial large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels and smooth muscle Ca^{2+} sparks. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 304(11), H1446-54.
- Katzung, B. G. (2013). *Farmacología básica y clínica* (12ª). McGrawHill.
- Kawasaki, H., Takasaki, K., Saito, A., y Goto, K. (1988). Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature*, 335(6186), 164–167.
- Kimura, H. (2012a). Metabolic Turnover of Hydrogen Sulfide. *Front. Physiol.*, 3, 101.
- Kimura, H. (2012b). Physiological and Pathophysiological Functions of Hydrogen Sulfide. In A. Hermann, G. F. Sitdikova, y T. M. Weiger (Eds.), *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology* (pp. 71–98). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Kimura, H. (2013). Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochem. Int.*, 63(5), 492–497.
- King, J., y Bhimji, S. S. (2018). *Physiology, Cardiovascular, Cardiac Output. StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Klabunde, R. E. (2012). *Cardiovascular Physiology Concepts*. (B. Sun, Ed.) (2nd ed.). Lippincott Williams y Wilkins.
- Kleinman, L. I., y Radford, E. P. (1964). Ventilation standards for small mammals. *J. Appl. Physiol.*, 19, 360–362.

- Krahl, M. E., Keltch, A. K., Neubeck, C. E., y Clowes, G. H. (1941). Studies on cell metabolism: V. Cytochrome oxidase activity in the egg of *Arbacia Punctulata*. *J. Gen. Physiol.*, 24(5), 597–617.
- Kulkarni, K. H., Monjok, E. M., Zeyssig, R., Kouamou, G., Bongmba, O. N., Opere, C. A., ... Ohia, S. E. (2009). Effect of hydrogen sulfide on sympathetic neurotransmission and catecholamine levels in isolated porcine iris-ciliary body. *Neurochem. Res.*, 34(3), 400–406.
- Levitt, M. D., Abdel-Rehim, M. S., y Furne, J. (2011). Free and Acid-Labile Hydrogen Sulfide Concentrations in Mouse Tissues: Anomalously High Free Hydrogen Sulfide in Aortic Tissue. *Antioxid. Redox Signal.*, 15(2), 373–378.
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., ... Moore, P. K. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 117(18), 2351–2360.
- Li, Q., y Lancaster, J. R. (2013). Chemical foundations of hydrogen sulfide biology. *Nitric Oxide*, 35, 21–34.
- Madamanchi, A. (2007). Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *Mcgill J. Med.*, 10(2), 99–104.
- Martelli, A., Testai, L., Breschi, M. C., Lawson, K., McKay, N. G., Miceli, F., ... Calderone, V. (2013). Vasorelaxation by hydrogen sulphide involves activation of Kv7 potassium channels. *Pharmacol. Res.*, 70(1), 27–34.
- Matarredona, E. R., Murillo-Carretero, M., Moreno-López, B., y Estrada, C. (2004). Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone. *Brain Res.*, 995(2), 274–284.
- Mazza, R., Pasqua, T., Cerra, M. C., Angelone, T., y Gattuso, A. (2013). Akt/eNOS signaling and PLN S-sulfhydration are involved in H₂S-dependent cardiac effects in frog and rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 305(4), R443-51.
- McMartin, L., y Summers, R. J. (1999). Functional analysis of desensitization of

- the beta-adrenoceptor signalling pathway in rat cardiac tissues following chronic isoprenaline infusion. *Br. J. Pharmacol.*, 127(4), 1012–1020.
- Meng,G.,Zhao,S.,Xie,L.,Han,Y.,y Ji,Y. (2018). Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.*, 175(8), 1146–1156.
- Mitchell,C.,y Davenport,S. (1924). Hydrogen sulphide literature. *Public Heal. Rep.*, 39, 1–13.
- Mitrukhina,O. B.,Yakovlev,A. V.,y Sitdikova,G. F. (2013). The effects of hydrogen sulfide on the processes of exo- and endocytosis of synaptic vesicles in the mouse motor nerve endings. *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, 7(2), 170–173.
- Mustafa,A. K.,Gadalla,M. M.,Sen,N.,Kim,S.,Mu,W.,Gazi,S. K.,... Snyder,S. H. (2009). H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.*, 2(96), ra72-ra72.
- Mustafa,A. K.,Sikka,G.,Gazi,S. K.,Steppan,J.,Jung,S. M.,Bhunia,A. K.,... Snyder,S. H. (2011). Hydrogen Sulfide as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Sulfhydrates Potassium Channels. *Circ. Res.*, 109(11), 1259–1268.
- Nagai,Y.,Tsugane,M.,Oka,J.-I.,y Kimura,H. (2004). Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J.*, 18(3), 557–559.
- Napoli,C.,Sica,V.,de Nigris,F.,Pignalosa,O.,Condorelli,M.,Ignarro,L. .,y Liguori,A. (2004). Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension. *Am. Heart J.*, 148(1), 172.
- Nicholls,P.,y Kim,J. K. (1981). Oxidation of sulphide by cytochrome aa3. *Biochim. Biophys. Acta*, 637(2), 312–320.
- O'Dell,T. J.,Hawkins,R. D.,Kandel,E. R.,y 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(24), 11285–11289.

- Packer, M. A., Stasiv, Y., Benraiss, A., Chmielnicki, E., Grinberg, A., Westphal, H., ... Enikolopov, G. (2003). Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *100*(16), 9566–9571.
- Paolocci, N., Katori, T., Champion, H. C., St. John, M. E., Miranda, K. M., Fukuto, J. M., ... Kass, D. A. (2003). Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO- in failing hearts: Independence from α -adrenergic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *100*(9), 5537–5542.
- Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., ... Szabó, C. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *106*(51), 21972–21977.
- Papapetropoulos, A., Whiteman, M., y Cirino, G. (2015). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br. J. Pharmacol.*, *172*(6), 1633–1637.
- Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.-Y., ... Haydon, P. G. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science (80-)*, *310*(5745), 113–116.
- Paul, B. D., y Snyder, S. H. (2015a). H₂S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydration. *Trends Biochem. Sci.*, *40*(11), 687–700.
- Paul, B. D., y Snyder, S. H. (2015b). Modes of Physiologic H₂S Signaling in the Brain and Peripheral Tissues. *Antioxid. Redox Signal.*, *22*(5), 411–423.
- Polhemus, D. J., Li, Z., Pattillo, C. B., Gojon, G., Gojon, G., Giordano, T., y Krum, H. (2015). A Novel Hydrogen Sulfide Prodrug, SG1002, Promotes Hydrogen Sulfide and Nitric Oxide Bioavailability in Heart Failure Patients. *Cardiovasc. Ther.*, *33*(4), 216–226.
- Porokhya, M. V., Abramochkin, D. V., Abramov, A. A., Kuzmin, V. S., y Sukhova, G. S. (2012). Inotropic effects of gaseous transmitters in isolated rat heart preparation. *Bull. Exp. Biol. Med.*, *153*(6), 855–857.
- Purves, D. (2004). *Neuroscience*. (D. Purves, G. Augustine, D. Fitzpatrick, W. Hall, y A. LaMantia, Eds.) (3rd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

- Russell, F. A., King, R., Smillie, S.-J., Kodji, X., y Brain, S. D. (2014). Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, *94*(4), 1099–1142.
- Sakuma, I., Togashi, H., Yoshioka, M., Saito, H., Yanagida, M., Tamura, M.,... Levi, R. (1992). NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circ. Res.*, *70*(3), 607–611.
- Salvi, A., Bankhele, P., Jamil, J. M., Kulkarni-Chitnis, M., Njie-Mbye, Y. F., Ohia, S. E., y Opere, C. A. (2016). Pharmacological Actions of Hydrogen Sulfide Donors on Sympathetic Neurotransmission in the Bovine Anterior Uvea, In Vitro. *Neurochem. Res.*, *41*(5), 1020–1028.
- Sha, L., Linden, D. R., Farrugia, G., y Szurszewski, J. H. (2013). Hydrogen sulfide selectively potentiates central preganglionic fast nicotinic synaptic input in mouse superior mesenteric ganglion. *J. Neurosci.*, *33*(31), 12638–12646.
- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., y Kimura, H. (2009). 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. *Antioxid. Redox Signal.*, *11*(4), 703–714.
- Shibley, R. E., y Tilden, J. H. (1947). A pithed rat preparation suitable for assaying pressor substances. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *64*(4), 453–455.
- Siebert, N., Cantré, D., Eipel, C., y Vollmar, B. (2008). H₂S contributes to the hepatic arterial buffer response and mediates vasorelaxation of the hepatic artery via activation of K⁺ ATP channels. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.*, *295*(6), G1266–G1273.
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozick-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M.,... Frid, M. G. (2013). The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.*, *75*(1), 23–47.

- Streeter, E., Hart, J., y Badoer, E. (2012). An investigation of the mechanisms of hydrogen sulfide-induced vasorelaxation in rat middle cerebral arteries. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, 385(10), 991–1002.
- Sun, Y.-G., Cao, Y.-X., Wang, W.-W., Ma, S.-F., Yao, T., y Zhu, Y.-C. (2008). Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.*, 79(4), 632–641.
- Sun, Y., Tang, C., Jin, H., y Du, J. (2011). The vasorelaxing effect of hydrogen sulfide on isolated rat aortic rings versus pulmonary artery rings. *Acta Pharmacol. Sin.*, 32(4), 456–464.
- Swan, K., Song, B. M., Chen, A. L., Chen, T. J., Chan, R. A., Guidry, B. T., ... Kadowitz, P. J. (2017). Analysis of decreases in systemic arterial pressure and heart rate in response to the hydrogen sulfide donor sodium sulfide. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, 313(4), H732–H743.
- Szabo, C. (2017). A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem. Pharmacol.*, 149(September), 5–19.
- Szijártó, I. A., Markó, L., Filipovic, M. R., Miljkovic, J. L., Tabeling, C., Tsvetkov, D., ... Gollasch, M. (2018). Cystathionine γ -Lyase-Produced Hydrogen Sulfide Controls Endothelial NO Bioavailability and Blood Pressure. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, 71(6), 1210–1217.
- Taguchi, T., Kawasaki, H., Imamura, T., y Takasaki, K. (1992). Endogenous calcitonin gene-related peptide mediates nonadrenergic noncholinergic depressor response to spinal cord stimulation in the pithed rat. *Circ. Res.*, 71(2), 357–364.
- Takatori, S., Zamami, Y., Mio, M., Kurosaki, Y., y Kawasaki, H. (2006). Chronic hyperinsulinemia enhances adrenergic vasoconstriction and decreases calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in pithed rats. *Hypertens. Res.*, 29(5), 361–368.
- Tang, G., Wu, L., Liang, W., y Wang, R. (2005). Direct stimulation of KATP

- channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle. *Mol. Pharmacol.*, 68(6), 1757–1764.
- Taniguchi, T., y Kimura, T. (1974). Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the formation of the iron-sulfur chromophore of adrenal ferredoxin. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.*, 364(2), 284–295.
- Tarizzo, V. I., y Dahlöf, C. (1989). Adrenaline-induced enhancement of the blood pressure response to sympathetic nerve stimulation in adrenal demedullated pithed rats. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.*, 340(2), 144–150.
- Taylor, J. G., y Bisognano, J. D. (2010). Baroreflex Stimulation in Antihypertensive Treatment. *Curr. Hypertens. Rep.*, 12(3), 176–181.
- Teicher, C., De Col, R., y Messlinger, K. (2017). Hydrogen Sulfide Mediating both Excitatory and Inhibitory Effects in a Rat Model of Meningeal Nociception and Headache Generation. *Front. Neurol.*, 8, 336.
- Tian, X. Y., Wong, W. T., Sayed, N., Luo, J., Tsang, S. Y., Bian, Z. X., ... Huang, Y. (2012). NaHS relaxes rat cerebral artery in vitro via inhibition of L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel. *Pharmacol. Res.*, 65(2), 239–246.
- Toda, N., Ayajiki, K., y Okamura, T. (2009). Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. *J. Hypertens.*, 27(10), 1929–1940.
- Togashi, H., Sakuma, I., Yoshioka, M., Kobayashi, T., Yasuda, H., Kitabatake, A., ... Levi, R. (1992). A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262(1), 343–347.
- Tortora, G., y Derrickson, B. (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología. Panamericana* (Vol. 13).
- Tykocki, N. R., Boerman, E. M., y Jackson, W. F. (2017). Smooth Muscle Ion Channels and Regulation of Vascular Tone in Resistance Arteries and Arterioles. In *Comprehensive Physiology* (Vol. 7, pp. 485–581). Hoboken, NJ, USA: John Wiley y Sons, Inc.
- Ubuka, T., Umemura, S., Yuasa, S., Kinuta, M., y Watanabe, K. (1978). Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat

- liver. *Physiol. Chem. Phys.*, 10(6), 483–500.
- van Koppen, C. J., y Kaiser, B. (2003). Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Pharmacol. Ther.*, 98(2), 197–220.
- Verma, A., Hirsch, D. J., Glatt, C. E., Ronnett, G. V., y Snyder, S. H. (1993). Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, 259(5093), 381–384.
- Wallace, J. L., Vaughan, D., Dicay, M., MacNaughton, W. K., y de Nucci, G. (2018). Hydrogen Sulfide-Releasing Therapeutics: Translation to the Clinic. *Antioxid. Redox Signal.*, 28(16), 1533–1540.
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.*, 16(13), 1792–1798.
- Wang, R. (2003). The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid. Redox Signal.*, 5(4).
- Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.*, 92(2), 791–896.
- Wang, R. (2014). Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem. Sci.*, 39(5), 227–232.
- Warenycia, M. W., Goodwin, L. R., Benishin, C. G., Reiffenstein, R. J., Francom, D. M., Taylor, J. D., y Dieken, F. P. (1989). Acute hydrogen sulfide poisoning: Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem. Pharmacol.*, 38(6), 973–981.
- Westfall, T., y Westfall, D. (2011). Neurotransmisión: sistemas nerviosos autónomo y motor somático. In L. Goodman, L. Brunton, B. Chabner, y B. Knollmann (Eds.), *Goodman y Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. (12^a, p. 2084). McGraw-Hill.
- White, B. J. O., Smith, P. A., y Dunn, W. R. (2013). Hydrogen sulphide-mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. *Br. J. Pharmacol.*, 168(4), 785–793.
- Whiteman, M., y Winyard, P. G. (2011). Hydrogen sulfide and inflammation: the good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*,

- 4(1), 13–32.
- Wintner, E. A., Deckwerth, T. L., Langston, W., Bengtsson, A., Leviten, D., Hill, P., ... Szabo, C. (2010). A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *Br. J. Pharmacol.*, 160(4), 941–957.
- Woodcock, E. A. (2007). ROLES OF α 1A - AND α 1B -ADRENOCEPTORS IN HEART: INSIGHTS FROM STUDIES OF GENETICALLY MODIFIED MICE. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 34(9), 884–888.
- Yamawaki, K., Zamami, Y., Kawasaki, H., y Takatori, S. (2017). Effects of endogenous nitric oxide on adrenergic nerve-mediated vasoconstriction and calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 802, 69–75.
- Yong, Q. C., Pan, T.-T., Hu, L.-F., y Bian, J.-S. (2008). Negative regulation of β -adrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 44(4), 701–710.
- Yoo, D., Jupiter, R. C., Pankey, E. A., Reddy, V. G., Edward, J. A., Swan, K. W., ... Kadowitz, P. J. (2015). Analysis of cardiovascular responses to the H₂S donors Na₂S and NaHS in the rat. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 309(4), H605-14.
- Yu, X., Cui, L., Wu, K., Zheng, X., Cayabyab, F., ZW, C., y Tang, C. (2014). Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clin. Chim. Acta*, 437, 78–87.
- Zhang, R., Sun, Y., Tsai, H., Tang, C., Jin, H., y Du, J. (2012). Hydrogen sulfide inhibits L-type calcium currents depending upon the protein sulfhydryl state in rat cardiomyocytes. *PLoS One*, 7(5), e37073.
- Zhang, R., Zhang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Lu, M., Lapointe, M., y Chopp, M. (2001). A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann. Neurol.*, 50(5), 602–611.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., y Wang, R. (2001a). The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.*, 20(21), 6008–6016.

- Zhao,W.,Zhang,J.,Lu,Y.,y Wang,R. (2001b). The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.*, 20(21), 6008–6016.
- Zhou,L.,y Zhu,D.-Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide*, 20(4), 223–230.
- Zhou,Q.-G.,Hu,Y.,Hua,Y.,Hu,M.,Luo,C.-X.,Han,X.,.... Zhu,D.-Y. (2007). Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis. *J. Neurochem.*, 103(5), 1843–1854.
- Zhuo,M.,Small,S. A.,Kandel,E. R.,y Hawkins,R. D. (1993). Nitric oxide and carbon monoxide produce activity-dependent long-term synaptic enhancement in hippocampus. *Science*, 260(5116), 1946–1950.

12. ANEXOS

10.5. Artículos

10.5.1 Centurión, D., **De la Cruz, S. H.**, Castillo-Santiago, S. V, Becerril-Chacón, M. E., Torres-Pérez, J. A., y Sánchez-López, A. (2018). NaHS prejunctionally inhibits the cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 823, 35–40.

10.5.2 Centurión, D., **De la Cruz, S. H.**, Gutiérrez-Lara, E. J., Beltrán-Ornelas, J. H., y Sánchez-López, A. (2016). Pharmacological evidence that NaHS inhibits the vasopressor responses induced by stimulation of the preganglionic sympathetic outflow in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 770, 40–5.

10.6 Congresos

10.6.1 LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Monterrey, Nuevo León, México.

10.6.2 Neuroscience 2017, the 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., USA.

10.6.3 5th World Congress on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine. Toronto, Ontario, Canadá.

10.7 Actividades académicas

10.7.1 Curso Pre-Congreso “Homeostasis energética” en el LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Monterrey, Nuevo León.

10.7.2 Asesoría técnica-académica de estudiantes del XXII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico del cual se derivó la siguiente publicación:

10.7.2.1 **De la Cruz, S. H.**, Medina-Terol, G. J., Beltrán-Ornelas, J. H., Gomez, C. B., Morato-Valderrama, Y., Sánchez-López, A., y Centurión, D. (2018). Pharmacological evidence that metformin blocks the vasopressor responses mediated by stimulation of α_1 - and α_2 -adrenoceptors in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 820.

10.7.3 Asesoría técnica tesis de licenciatura “Evaluación del efecto farmacológico de metformina sobre el sistema nervioso simpático en el modelo de rata descerebrada y desmedulada” de la alumna Grecia Josefa Medina Terol de la Universidad Autónoma de Sinaloa.