



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Efecto del sulfuro de hidrógeno en las alteraciones  
cardiovasculares inducidas por el traumatismo  
craneoencefálico en rata”**

T E S I S

Que presenta

**M. EN C. SAÚL HUERTA DE LA CRUZ**

Para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL**

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

Ciudad de México

Agosto, 2022



El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. David Centurión Pacheco en el laboratorio 6 y en colaboración con la Dra. Luisa Rocha en el laboratorio 8 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 de doctorado 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 estar conmigo en cada paso, nunca dejarme rendir y por siempre mostrar interés en lo que hago. No sería lo que soy sin ustedes

**A MI HERMANA**

**Silvia Huerta de la Cruz**

Por tu comprensión y apoyo incondicional. Gracias por siempre tener palabras de aliento para fortalecerme. Eres uno de los principales motores de mi vida.

**A MIS TÍAS**

En especial a mi tía Oti y Silvia, por siempre guiarme, estar para mí y motivarme para seguir creciendo.

**A MIS PRIMOS**

En especial a Leo y Ali que, sin saberlo, siempre me motivan a salir adelante. Gracias por confiar en mí siempre y darme fuerzas.

**¡Los amo infinitamente!**

*Once we accept our limits, we go beyond them*

-Albert Einstein

### **AL CINVESTAV Y CONACYT**

Por las facilidades proporcionadas para desarrollar este proyecto.

### **AL DR. DAVID CENTURIÓN PACHECO**

Por ver siempre lo mejor de mí y permitirme aprender y desarrollarme de la mejor manera posible. Por su confianza y las lecciones tanto académicas como de vida.  
Mucho de lo que soy ahora es gracias a usted

### **A LA DRA. LUISA ROCHA**

Por adoptarme como un miembro más de su laboratorio y por siempre exigirme más para demostrar que nunca hay que darse por vencido. Gracias por todas las enseñanzas y por ayudarme a desarrollar este proyecto.

### **A MI COMITÉ SINODAL**

**Dra. Francis Pérez Severiano, Dra. Janet Murbartián Aguilar y Dr. Francisco Torres Quiroz.** Por su tiempo, aportaciones y sugerencias para mejorar el presente proyecto pero sobre todo por siempre exigirme y hacerme dar lo mejor de mí.

### **A ERICK J. RODRÍGUEZ PALMA**

Por estar a mi lado, apoyarme y motivarme a salir adelante. Por ayudarme con la realización del proyecto. Por siempre hacer que la distancia de casa sea menos pesada. Eres una pieza clave de mi vida y no hay nadie con quien me gustaría seguir creciendo en este mundo de la ciencia y seguir compartiendo aventuras.

### **A MIS PEQUEÑOS SALTAMONTES**

**Grecia J. Medina Terol.** Las palabras nunca serán suficientes para agradecerte tu amistad y apoyo incondicional. Por enseñarme lo que es la perseverancia y la dedicación. Por las risas, llantos, desveladas, alegrías y tristezas. Gracias por siempre confiar ciegamente en mí y permitirme ser parte de tu crecimiento y formación.

**Félix I. López Preza.** Por confiar en mí desde un inicio y dejarme ser parte de tu formación. Porque me has enseñado a que las adversidades se vuelven pequeñas cuando uno tiene ganas de salir adelante.

Sé que los dos llegarán muy lejos y nunca olviden que ustedes pueden

### **A MIS AMIGOS**

**Cindy Santiago Castañeda.** Por todas tus enseñanzas y por tu apoyo incondicional para poder realizar este proyecto. Por tu amistad y por compartir todos estos años juntos, nunca olvides que eres capaz de todo lo que te propongas.

**Daniel Fonseca Barrientos, Eduardo Ávila Díaz y Christopher Martínez Aguirre.** Por hacer que este trayecto durante el posgrado fuera más fácil. Por su amistad, consejos y momentos que siempre llevaré en el corazón.

**Hernán Beltrán y Diana L. Silva Velasco.** Por estar en cada momento de mi vida y el apoyo y consejos que me brindaron. Por confiar siempre en mí y ayudarme a crecer.

### **A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO 6**

**Dra. Araceli Sánchez López.** Por el apoyo brindado para la realización de este proyecto y por todos los consejos tanto académicos como de vida que me han permitido crecer en todos los aspectos de mi vida.

**Grecia J. Medina Terol.** Por todo el apoyo para la realización de los experimentos de este proyecto y por ser siempre mi cómplice y seguirme en mis ocurrencias tanto académicas como personales.

**Félix I. López Preza y Arturo Sánchez Serrano.** Por recordarme que nunca hay que dejar de sorprendernos y trabajar duro aún en situaciones difíciles.

**Hernán Beltrán y Diana L. Silva Velasco.** Por siempre hacerme reír y aguantarme aún en mis peores días.

**Dr. Jorge Tapia Martínez.** Por las experiencias compartidas y por enseñarme lo que es la paciencia y la perseverancia.

Por ser los mejores *labmates* del mundo. Los quiero

### **A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO 8**

**Cindy Santiago, Christopher Martínez, Alma Pinedo, Daniel Fonseca, Dr. Daniel Pérez, Dra. Ángeles Núñez, Francia Carmona, Monserrat Fuentes.** Por siempre darme ánimos para salir adelante. Por adoptarme como uno más de ustedes y compartir siempre conmigo conocimientos y consejos que me ayudaron a crecer.

### **AL PERSONAL DE LA UNIDAD COAPA DEL CINVESTAV**

Por todo el apoyo brindado durante todo este tiempo.

En especial al Lic. Víctor Manuel Mendoza Salas por su apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

Al Sr. Ramón Martínez y el personal de bioterio por ser parte fundamental en la realización de este proyecto.

Al Ing. José Fernández Calderón por siempre ayudarnos a salir de los apuros y tener siempre la mejor disposición.

**¡MUCHAS GRACIAS!**

## INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ABREVIATURAS .....	xii
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT .....	xviii
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Traumatismo craneoencefálico.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1. Lesiones primarias .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Lesiones secundarias .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3. Manifestaciones sistémicas .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Sistema cardiovascular.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.1. Componentes y sus funciones.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1.1. El corazón.....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.1.2. Los vasos sanguíneos .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.2. El sistema nervioso autónomo como regulador del sistema cardiovascular .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2.2.1. Estructuras centrales que regulan el sistema nervioso autónomo.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.2.2. Sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Sulfuro de hidrógeno .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.1. Generalidades .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3.2. Historia.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.3. Síntesis.....</b>	<b>20</b>

1.3.4. Persulfuración de proteínas .....	22
1.3.5. Metabolismo .....	23
2. ANTECEDENTES .....	26
2.1. Disfunción autonómica post-TCE.....	26
2.2. Hipertensión y disfunción cardiaca post-TCE.....	39
2.3. Efecto del H <sub>2</sub> S en el sistema nervioso autónomo a nivel central .....	40
2.4. Efecto del H <sub>2</sub> S en neuronas periféricas que regulan al sistema cardiovascular .....	43
2.5. Efecto de los gasotransmisores en el TCE .....	44
2.5.1. Sulfuro de hidrógeno.....	44
3. JUSTIFICACIÓN .....	51
4. HIPÓTESIS.....	52
5. OBJETIVOS.....	53
5.1. Objetivo general.....	53
5.2. Objetivos particulares.....	53
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
6.1. Animales .....	54
6.2. Grupos experimentales .....	54
6.2.1. Objetivo 1 .....	54
6.2.2. Objetivo 2.....	55
6.2.3. Objetivo 3.....	57
6.3. Modelo de percusión lateral por fluido.....	59

<b>6.4. Detección de las enzimas CBS, CSE y 3-MST en el tallo y el hipotálamo.....</b>	<b>61</b>
<b>6.5. Evaluación de la función sensoriomotora y la coordinación motora.....</b>	<b>62</b>
<b>6.5.1. Neuroscore.....</b>	<b>62</b>
<b>6.5.1.1. Extensión de extremidades anteriores .....</b>	<b>63</b>
<b>6.5.1.2. Extensión de extremidades posteriores .....</b>	<b>64</b>
<b>6.5.1.3. Pulsión lateral.....</b>	<b>65</b>
<b>6.5.1.4. Plano inclinado.....</b>	<b>66</b>
<b>6.5.2. Barra transversa .....</b>	<b>67</b>
<b>6.6. Determinación de las variables hemodinámicas.....</b>	<b>68</b>
<b>6.7. Determinación de la actividad simpática en el modelo de la rata descerebrada y desmedulada .....</b>	<b>69</b>
<b>6.7.1. Diseño experimental en las ratas descerebradas y desmedulada.....</b>	<b>70</b>
<b>6.8. Fármacos.....</b>	<b>72</b>
<b>6.9. Análisis estadístico .....</b>	<b>72</b>
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>74</b>
<b>7.1. Alteraciones inducidas por el TCE severo.....</b>	<b>74</b>
<b>7.1.1. Expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el tallo y el hipotálamo.....</b>	<b>76</b>
<b>7.1.2. Función sensoriomotora y peso corporal .....</b>	<b>78</b>
<b>7.2. Efecto del NaHS en las alteraciones inducidas por el TCE.....</b>	<b>87</b>
<b>7.2.1. Expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el tallo y el hipotálamo.....</b>	<b>88</b>

<b>7.2.2. Función sensoriomotora .....</b>	<b>90</b>
<b>7.2.3. Variables hemodinámicas .....</b>	<b>94</b>
<b>7.2.4. Actividad del tono simpático vasopresor .....</b>	<b>99</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>104</b>
<b>8.1. General.....</b>	<b>104</b>
<b>8.2. Alteraciones en la expresión proteica de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S.....</b>	<b>105</b>
<b>8.3. Disfunción sensoriomotora y alteraciones en la ganancia de peso .....</b>	<b>108</b>
<b>8.4. Alteraciones hemodinámicas.....</b>	<b>111</b>
<b>8.5. Disfunción autonómica.....</b>	<b>113</b>
<b>9. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>118</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>119</b>
<b>11. REFERENCIAS .....</b>	<b>121</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>158</b>

---



---

ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Mecanismos fisiopatológicos de la lesión secundaria post-TCE. .... 7

**Figura 2.** Regulación del sistema cardiovascular a nivel central por el reflejo barorreceptor. .... 14

**Figura 3.** Características del sistema nervioso parasimpático. .... 15

**Figura 4.** Características del sistema nervioso simpático. .... 16

**Figura 5.** Mecanismos transduccionales de los receptores adrenérgicos. .... 17

**Figura 6.** Biosíntesis de sulfuro de hidrógeno. .... 22

**Figura 7.** Mecanismos de persulfuración de proteínas. .... 24

**Figura 8.** Metabolismo del sulfuro de hidrógeno. .... 25

**Figura 9.** Alteraciones cardiovasculares post-TCE. .... 28

**Figura 10.** Efectos del H<sub>2</sub>S en las alteraciones neurológicas post-TCE. .... 50

**Figura 11.** Justificación. .... 51

**Figura 12.** Diseño experimental y curso temporal de los experimentos realizados para el objetivo 1. .... 56

**Figura 13.** Diseño experimental y curso temporal de los experimentos realizados para el objetivo 2. .... 57

**Figura 14.** Diseño experimental y curso temporal de los experimentos realizados para el objetivo 3. .... 59

**Figura 15.** Protocolo experimental para la inducción del TCE severo mediante el modelo de percusión lateral por fluidos. .... 60

**Figura 16.** Procedimiento experimental para la realización de la técnica de Western blot. .... 62

**Figura 17.** Prueba de extensión de extremidades posteriores del *neuroscore* ..... 64

**Figura 18.** Prueba de extensión de extremidades posteriores del *neuroscore*. .... 65

**Figura 19.** Prueba de pulsión lateral del *neuroscore*. .... 66

**Figura 20.** Prueba de pulsión lateral del *neuroscore*. .... 67

<b>Figura 21.</b> Prueba de barra transversa.....	68
<b>Figura 22.</b> Método pletismográfico para la medición de las variables hemodinámicas. ....	69
<b>Figura 23.</b> Protocolo experimental realizado en el modelo de rata descerebrada y desmedulada.....	71
<b>Figura 24.</b> Expresión de las enzimas que sintetizan H <sub>2</sub> S en el hipotálamo después del TCE severo.....	76
<b>Figura 25.</b> Expresión de las enzimas que sintetizan H <sub>2</sub> S en el tallo después del TCE severo.....	77
<b>Figura 26.</b> Disfunción sensoriomotora post-TCE severo.....	79
<b>Figura 27.</b> Registro del peso corporal post-TCE severo.....	80
<b>Figura 28.</b> Alteraciones hemodinámicas en animales despiertos después del TCE moderado y severo. ....	82
<b>Figura 29.</b> Alteraciones inducidas por el TCE severo sobre las respuestas vasopresoras al día 7 post-TCE. ....	83
<b>Figura 30.</b> Alteraciones inducidas por el TCE severo sobre las respuestas vasopresoras al día 14 post-TCE.....	84
<b>Figura 31.</b> Alteraciones inducidas por el TCE severo sobre las respuestas vasopresoras al día 21 post-TCE.....	84
<b>Figura 32.</b> Alteraciones inducidas por el TCE severo sobre las respuestas vasopresoras. ....	85
<b>Figura 33.</b> Resumen de resultados del experimento 1. ....	86
<b>Figura 34.</b> Efecto del tratamiento subcrónico con NaHS en los cambios de la expresión proteica post-TCE severo en el hipotálamo. ....	89
<b>Figura 35.</b> Efecto del tratamiento subcrónico con NaHS en los cambios de la expresión proteica post-TCE severo en el tallo cerebral. ....	90
<b>Figura 36.</b> Efecto del NaHS en la disfunción sensoriomotora inducida por el TCE severo ( <i>neuroscore</i> ).....	91
<b>Figura 37.</b> Efecto del NaHS en la disfunción de la coordinación motora inducida por el TCE severo (tiempo en la barra transversa). ....	92

<b>Figura 38.</b> Efecto del NaHS en la disfunción de la coordinación motora inducida por el TCE severo (puntaje en la barra transversa).....	93
<b>Figura 39.</b> Efecto del NaHS en la pérdida de peso corporal inducida por el TCE severo.....	94
<b>Figura 40.</b> Efecto del NaHS en los cambios en la frecuencia cardíaca post-TCE severo.....	95
<b>Figura 41.</b> Efecto del NaHS en los cambios en la presión arterial sistólica post-TCE severo.....	97
<b>Figura 42.</b> Efecto del NaHS en los cambios en la presión arterial diastólica post-TCE severo.....	98
<b>Figura 43.</b> Efecto del NaHS en los cambios en la presión arterial media post-TCE severo.....	99
<b>Figura 44.</b> Efecto del PBS en las alteraciones simpáticas inducidas por el TCE severo.....	100
<b>Figura 45.</b> Efecto de 1.8 mg/kg NaHS en las alteraciones simpáticas inducidas por el TCE severo.....	101
<b>Figura 46.</b> Efecto de 3.1 mg/kg NaHS en las alteraciones simpáticas inducidas por el TCE severo.....	102
<b>Figura 47.</b> Efecto de 5.6 mg/kg NaHS en las alteraciones simpáticas inducidas por el TCE severo.....	102
<b>Figura 48.</b> Resumen de resultados del experimento 2.....	103

---



---

ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de los gasotransmisores .....	17
<b>Tabla 2.</b> Estudios clínicos que demuestran las alteraciones cardiovasculares post-TCE. ....	30
<b>Tabla 3.</b> Estudios clínicos que demuestran las alteraciones cardiovasculares post-TCE. ....	35
<b>Tabla 4.</b> Efecto de la modulación de los niveles de H <sub>2</sub> S en distintos modelos de lesión cerebral .....	47
<b>Tabla 5.</b> Información de la presión del golpe (atm) y el neuroscore en los grupos utilizados para la caracterización de los cambios en la expresión proteica de las enzimas que sintetizan H <sub>2</sub> S inducidos por el TCE severo....	74
<b>Tabla 6.</b> Información de la presión del golpe (atm) y el neuroscore en los grupos utilizados para la caracterización de los cambios hemodinámicos y sensoriomotores inducidos por el TCE. ....	75
<b>Tabla 7.</b> Información de la presión del golpe (atm) y el neuroscore en los grupos utilizados para la caracterización de los cambios hemodinámicos y sensoriomotores inducidos por el TCE severo.....	75
<b>Tabla 8.</b> Información de la presión del golpe (atm) y neuroscore en los grupos que se utilizaron para evaluar el efecto de la administración de NaHS en los cambios de la expresión proteica inducidos por el TCE severo.....	87
<b>Tabla 9.</b> Información de la presión del golpe (atm) y neuroscore en los grupos que se utilizaron para evaluar el efecto de la administración de NaHS en las alteraciones hemodinámicas y simpáticas post-TCE.....	88

---

---

**ABREVIATURAS**

3-MST	3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa
ACh	Acetilcolina
Akt	Cinasa B de proteínas
ANOVA	Análisis de varianza
AOOA	ácido amino-oxiacético
AQP4	Acuaporina-4
atm	Atmósferas
ATP	Adenosina trifosfato
A $\beta$	Proteína $\beta$ amiloide
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
BK <sub>Ca</sub>	Canal de potasio dependiente de calcio de gran conductancia
CAT	cistationina-amino transferasa
CBS	cistationina- $\beta$ -sintetasa
CCI	Impacto cortical controlado
CFC	Complejo de la frecuencia cardiaca
CGRP	péptido relacionado al gen de la calcitonina
CO	Monóxido de carbono
COX2	Ciclooxigenasa 2
CSE	cistationina- $\gamma$ -liasa
CVLM	Médula caudal ventrolateral
D $\beta$ H	Dopamina- $\beta$ -hidroxilasa
EAAT	Transportador de glutamato
ECG	Electrocardiograma
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
FC	Frecuencia cardiaca
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GS	Ganglio simpático

---



---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
H <sub>2</sub> S	Sulfuro de hidrógeno
H <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Disulfuro de hidrógeno
HA	Hidroxilamina
HR	Humedad relativa
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IVH	Hemorragia intraventricular
K <sub>ATP</sub>	Canales de potasio dependientes de ATP
Keap1	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch
KO	Knock out
L-Cis	L-Cisteína
L-NAME	L-N <sup>G</sup> -Nitroarginina Metil Ester
MCAO	Oclusión de la arteria cerebral media
MLV	Músculo liso vascular
MRI	Imagen por resonancia magnética
mRNA	RNA mensajero
MST1	Proteína estimuladora de macrófagos
NaHS	Sulfhidrato de sodio
nAmb	Núcleo ambiguo
NF $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2
NS	<i>Neuroscore</i>
NTS	Núcleo del tracto solitario
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido

OH <sup>-</sup>	Radical hidroxilo
P2Y1	Receptor purinérgico P2Y 1
PA	Presión arterial
PACAP	polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria
PAG	Sustancia gris periacueductal
PAM	Presión arterial media
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Buffer de fosfato
PgP	Glicoproteína P
PKC	Proteína cinasa C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A2
PSH	hiperactividad simpática paroxística
PVDF	fluoruro de polivinilideno
PVN	Núcleo paraventricular
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RVLM	Médula rostral ventrolateral
SAH	Hemorragia subaracnoidea
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-Dodecilsulfato sódico
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Nitroprusiato de sodio
SRB	Sensibilidad del reflejo barorreceptor
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TH	Tirosina hidroxilasa
TJ	Uniones estrechas
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
TRPA1	Receptor de potencial transitorio A1
TRPV1	Receptor de potencial transitorio V1
TRPV4	Receptor de potencial transitorio V4

## ABREVIATURAS

---

TSM	tiol-S-metiltransferasa
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VFC	Variabilidad de la frecuencia cardiaca
Xn	Nervio vago

**RESUMEN**

El traumatismo craneoencefálico (TCE) representa un problema de salud pública a nivel mundial que afecta el sistema nervioso tanto central como periférico que regula al sistema cardiovascular. A la fecha, las aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de las alteraciones cardiovasculares inducidas por el TCE son limitadas. En este sentido, el sulfuro de hidrogeno ( $H_2S$ ), un gasotransmisor novedoso sintetizado por las enzimas cistationina- $\gamma$ -liasa (CSE), cistationina- $\beta$ -sintasa (CBS), y 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST), ha sido propuesto como una molécula cardio- y neuroprotectora. Por lo tanto, este estudio fue diseñado para determinar el efecto del tratamiento subcrónico con NaHS (un donador de  $H_2S$ ) sobre las alteraciones en las enzimas que sintetizan  $H_2S$  en el tallo y el hipotálamo, las variables hemodinámicas y en el tono simpático vasopresor observadas después del TCE severo. Para tal propósito, los animales se sometieron a un TCE severo con el modelo de percusión lateral por fluido. Los cambios en la expresión proteica se midieron por Western blot; mientras que las variables hemodinámicas y simpáticas se evaluaron por el método plestismográfico y el modelo de rata descerebrada y desmedulada, respectivamente. Los animales con TCE fueron tratados con administraciones i.p. diarias de NaHS (1.8, 3.1 y 5.6 mg/kg) durante 7 días después de la inducción del TCE severo empezando al día 1 post-TCE. Después del TCE severo, los animales mostraron: (1) una disminución de la CBS y la CSE en el hipotálamo y el tallo cerebral; mientras que la 3-MST disminuyó en el hipotálamo pero no en el tallo cerebral comparado con el grupo *sham*; (2) un incremento en la frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica, diastólica y media; (3) hipertactividad simpática; (4) disminución en las respuestas inducidas por noradrenalina (un agonista adrenérgico  $\alpha_{1/2}$ ) y UK 14,304 (un agonista adrenérgico selectivo  $\alpha_2$ ); y (5) disfunción sensoriomotora y pérdida de la coordinación motora. De manera interesante, la administración de NaHS (3.1 mg/kg) restauró la expresión de la CBS y CSE en el hipotálamo al día 7 post-TCE y la expresión de la CSE en el

tallo cerebral al día 7 y 28 post-TCE. Además, la administración de NaHS (3.1 y 5.6 mg/kg) previno el desarrollo de las alteraciones hemodinámicas y disminuyó la hiperactividad simpática, así como las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina pero no tuvo efecto sobre las alteraciones motoras y sensoriomotoras. En su conjunto, nuestros resultados muestran que la administración de NaHS: (1) restaura la expresión proteica de la CBS y CSE de manera dependiente del tiempo y del tejido evaluado sin efecto significativo en la expresión de la 3-MST; y (2) previene las alteraciones hemodinámicas por disminución de la hiperactividad simpática post-TCE. Estos resultados sugieren un papel terapéutico potencial del H<sub>2</sub>S en las alteraciones cardiovasculares sistémicas observadas después del TCE severo.

**ABSTRACT**

Traumatic Brain Injury (TBI) represents a critical public health problem worldwide that affects central and peripheral nervous systems regulating the cardiovascular system. Up to date, the therapeutic approaches for the treatment of TBI-induced cardiovascular impairments are limited. In this regard, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), a novel gasotransmitter synthesized by cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE), cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) enzymes, has been proposed as a neuro- and cardio-protective molecule. Therefore, this study was designed to determine the effect of subchronic treatment with NaHS (an H<sub>2</sub>S donor) on H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes, hemodynamic, and vasopressor sympathetic outflow impairments induced by severe TBI. For that purpose, animals were submitted to a severe TBI by the lateral fluid percussion injury model. The changes in CBS, CSE, and 3-MST protein expression in the hypothalamus and brainstem were measured by western blot, meanwhile, the hemodynamic variables and sympathetic activity were assessed by the plethysmographic method and the pithed rat model, respectively. Injured animals were treated with i.p. daily injections of NaHS, an H<sub>2</sub>S donor, (1.8, 3.1 and 5.6 mg/kg) during 7 days after severe TBI, starting one day after TBI induction. After severe TBI, the animals showed: (1) a decrease in CBS and CSE protein expression in the hypothalamus and brainstem; meanwhile, 3-MST protein expression diminished in the hypothalamus but not brainstem compared to the sham group; (2) an increase in heart rate, systolic, diastolic and mean blood pressure; (3) progressive sympathetic hyperactivity; and (4) a decrease on vasopressor responses induced by noradrenaline ( $\alpha_{1/2}$ -adrenoceptors agonist) and UK 14,304 (selective  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist). Remarkably, NaHS administration (3.1 mg/kg) restored CBS and CSE but not 3-MST protein expression in the hypothalamus at day 28 post-TBI and re-established only CSE in brainstem 7 and 28 days after severe TBI. Furthermore, NaHS administration (3.1 and 5.6 mg/kg) after TBI prevented the development of the

---

---

impairments in hemodynamic variables and decreased the sympathetic hyperactivity, as well as the noradrenaline-induced vasopressor responses with no effect on sensorimotor dysfunction. Taken together, our results show that NaHS: (1) restores CBS and CSE protein expression in a time- and tissue-dependent manner with no effect on 3-MST expression, and (2) ameliorates the hemodynamic and sympathetic system impairments observed after TBI. These findings shed further light on the potential therapeutic role of H<sub>2</sub>S for systemic cardiovascular impairments observed after severe TBI.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Traumatismo craneoencefálico

El traumatismo craneoencefálico (TCE) se define como una disrupción en el funcionamiento normal del cerebro causada por una fuerza física externa que puede ser un golpe, una sacudida o un objeto penetrante que entra al tejido cerebral. Mientras que el personal militar, los atletas y otros grupos específicos se enfrentan a un alto riesgo de sufrir un TCE, a nivel de la población general la prevalencia global de un traumatismo craneal en humanos ha permanecido similar desde la época de los neandertales hasta el humano moderno (Beier et al., 2018). Se ha estimado que el TCE afecta a alrededor de 69 millones de personas alrededor del mundo cada año (Dewan et al., 2018); además de ocupar el 5° lugar de condiciones incapacitantes (GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators, 2019). En nuestro país, el TCE tiene un índice de mortalidad de 38.8 por cada 100 mil habitantes, lo que lo posiciona como la 4ª causa de muerte (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Ontiveros et al., 2014).

Además de las consecuencias para los pacientes, el TCE representa un problema financiero significativo para el sistema de salud de cualquier gobierno. De hecho, el costo económico del TCE se ha estimado en aproximadamente 76.5 mil millones de dólares, incluyendo la atención de costos directos e indirectos (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Por lo que, el TCE no solo representa un problema de salud creciente en todo el mundo sino que también impacta en la economía de los países, particularmente aquellos países que son de ingresos bajos o medios (Rubiano et al., 2015).

Típicamente, la fisiopatología del TCE se puede dividir en lesión primaria y lesión secundaria. De manera aguda, el TCE se caracteriza por signos clínicos que incluyen la disminución o pérdida de la consciencia, amnesia, alteraciones en el estado mental y déficits neurológicos focales

como debilidad muscular, pérdida de la visión, pensamiento lento o dificultad para hablar (AANS, 2021). A largo plazo, el TCE puede inducir incapacidad, enfermedades neurodegenerativas o alteraciones a nivel sistémico (Frieden et al., 2015; Goldstein et al., 2017; McDonald et al., 2020).

### **1.1.1. Lesiones primarias**

La lesión primaria representa el daño mecánico temprano que induce daño focal y difuso inmediatamente después del traumatismo e incluye: (1) hematomas (Prichep et al., 2015); (2) hemorragia intracerebral, subdural o epidural (Kurland et al., 2012); (3) disminución del flujo sanguíneo cerebral (Vavilala et al., 2008); (4) fracturas de cráneo (Yellinek et al., 2016); (4) contusiones de golpe y contragolpe (Harish et al., 2015); y (5) lesión difusa inducida por la fuerza de la rápida aceleración y desaceleración que rompe axones neuronales, oligodendrocitos y vasos sanguíneos (Xu et al., 2007).

Dentro de las lesiones primarias puede haber heterogeneidad en los hallazgos patológicos de pacientes con TCE severo. Así, se han descrito 6 patrones diferentes de lesión que pueden ocurrir solos o en combinación y que resultan en una disminución de la función neurológica. Estos patrones incluyen: (1) hematoma epidural; (2) hematomas y contusiones parenquimales; (3) hematomas subdurales; (4) hemorragia subaracnoidea con hemorragia intraventricular (SAH/IVH, por sus siglas en inglés); (5) lesión axonal difusa; y (6) edema cerebral difuso (Durham et al., 2000).

### **1.1.2. Lesiones secundarias**

La lesión secundaria se presenta en respuesta al conjunto de eventos químicos, moleculares y bioquímicos que se desencadenan por la lesión primaria y se refiere a las consecuencias a largo plazo después del TCE. Las lesiones secundarias incluyen: (1) excitotoxicidad (Baker et al.,

1993); (2) neuroinflamación (Lozano et al., 2015); (3) estrés oxidante (Daglas & Adlard, 2018; Graf et al., 1984).; (4) alteraciones en la unión neurovascular (Mughal et al., 2021; Szarka et al., 2018); y (5) disfunción autonómica (Goldstein et al., 2017).

Dentro de las lesiones secundarias, se ha descrito que la transmisión neuronal se ve afectada desde los primeros minutos después de un TCE debido a la liberación de glutamato derivada de la lesión primaria (Globus et al., 1995; Palmer et al., 1993). La liberación excesiva de glutamato y la disminución en la liberación de GABA desregula el balance que existe entre la transmisión excitatoria e inhibitoria. Lo anterior se ve incrementado por la disminución de los transportadores de glutamato en los astrocitos, lo que favorece la activación de los receptores NMDA post-sinápticos (Dorsett et al., 2017; Van Landeghem et al., 2006). La sobreactivación de los receptores NMDA induce un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio lo que promueve la síntesis de la proteína  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) y la muerte neuronal (Luo et al., 2019; Naylor et al., 2013). El daño por excitotoxicidad también se ve incrementado por la liberación de ATP, mismo que interactúa con el receptor P2Y1 contribuyendo a la activación del receptor NMDA (Domercq et al., 2006; Simões et al., 2018) (Figura 1A).

Además, después de que se presenta un TCE, la fuerza mecánica daña la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que permite el reclutamiento de células desde los vasos sanguíneos, la formación de edema y la liberación de citocinas como la interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Cederberg & Siesjö, 2010; Keating & Cullen, 2021; Shapira et al., 1993). El ambiente irritado dentro del cerebro media la activación de microglia y promueve un incremento la expresión de mediadores pro-inflamatorios como el factor nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), interleucina  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), IL-6 e IL-8, así como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX2) (Impellizzeri

et al., 2016; Utagawa et al., 2008; Witcher et al., 2021). En relación a la inflamación, la proteína S100A9 desempeña un papel esencial en la modulación de la respuesta inmune al estimular el reclutamiento de leucocitos e induciendo la secreción de citocinas. De hecho, durante el TCE existe un incremento de la proteína S100A9 que puede llevar a la agregación neuronal de la proteína A $\beta$  (Simard et al., 2013). El ambiente estresor, junto con los procesos pro-inflamatorios, conllevan a muerte celular, gliosis, hiperexcitabilidad y acumulación de  $\alpha$ -sinucleína que pueden desencadenar procesos de neurodegeneración (Figura 1B).

El estrés oxidante que se presenta en respuesta al trauma es promovido por la infiltración de eritrocitos al cerebro. El hierro contenido en la hemoglobina de los eritrocitos cataliza la formación del radical hidroxilo (OH $\cdot$ ) y superóxido (O $2\cdot^-$ ) (Daglas & Adlard, 2018; Graf et al., 1984). Los requerimientos energéticos de las neuronas y de las células de la glía generan disfunción de la cadena respiratoria, lo que contribuye a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). La disfunción de la mitocondria reduce la producción de ATP, afectando los sistemas de transporte que dependen de ATP como la Na $^+$ , K $^+$  ATPasa (Lima et al., 2008). Adicionalmente, la actividad enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa/Citocromo C también se encuentra reducida, contribuyendo a la sobreproducción de las ROS (Li et al., 2006; Prins et al., 2013). El incremento en los niveles de ROS ocasiona lipoperoxidación de la membrana que, a su vez, genera la producción de 4-hidroxi-2-nonenal que incrementa la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína (Bae et al., 2013) (Figura 1C).

Se ha demostrado que el TCE experimental altera la hemodinámica cerebral por disminución de la funcionalidad de los canales Kir2.1 que conlleva a una alteración de la hiperemia funcional (Mughal et al., 2021). Además, también se ha reportado que después del TCE existen alteraciones en la constricción de las arterias cerebrales por activación

de los canales  $BK_{Ca}$  a través de una vía dependiente de ROS y TRPV4 en el músculo liso vascular (Szarka et al., 2018). La acumulación de la proteína tau fosforilada promueve la remodelación de las paredes de los vasos sanguíneos y disfunción de la vasculatura cerebral generando una caída en la perfusión del tejido cerebral que desencadena la activación de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ - secretasas (Gren et al., 2016; Merlini et al., 2016; Østergaard et al., 2014). La producción de ROS contribuye al incremento de la permeabilidad de la BHE induciendo lipoperoxidación y la redistribución y degradación de las proteínas asociadas a las uniones estrechas (TJ, por sus siglas en inglés), como la ocludina y claudina-5 (Schreibelt et al., 2007; Smith et al., 1994) (Figura 1D).

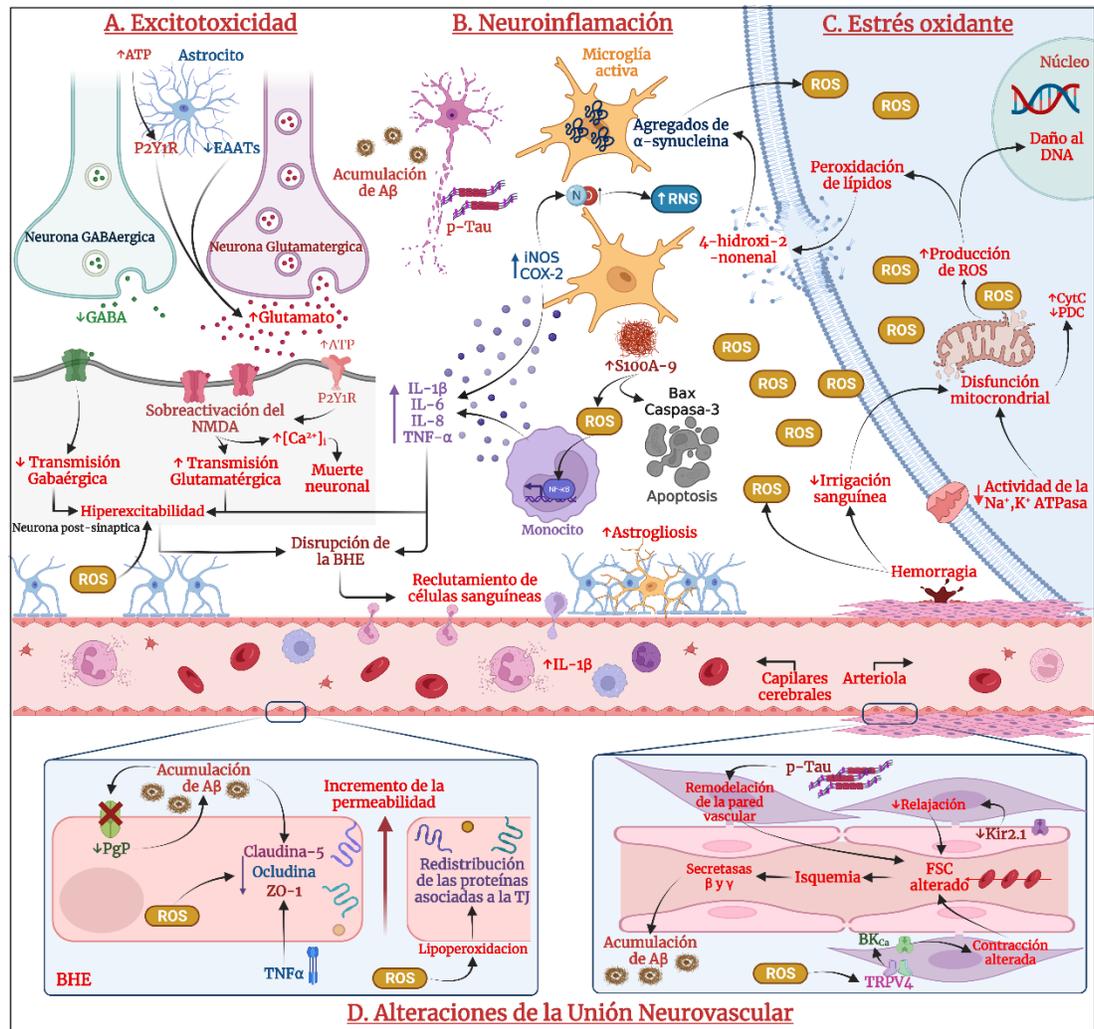
Es importante mencionar que la lesión secundaria se establece bajo una gran variedad de factores de riesgo y de manera progresiva a través de las semanas, o incluso los años después del trauma. Lo anterior provee una ventana de tiempo conveniente para una intervención terapéutica que pueda evitar la aparición de enfermedades neurodegenerativas o manifestaciones sistémicas.

### **1.1.3. Manifestaciones sistémicas**

El TCE se asocia principalmente con alteraciones a nivel del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que el TCE no se confina únicamente al SNC y puede inducir una gran variedad de efectos sistémicos que alteran el funcionamiento correcto del sistema cardiovascular, gastrointestinal, musculo-esquelético e inmune, además de los pulmones, el hígado, y los riñones. Asimismo, se ha sugerido que las alteraciones periféricas inducidas por el TCE pueden contribuir a un déficit neurológico a largo plazo (McDonald et al., 2020). De hecho, las alteraciones sistémicas se presentan en aproximadamente el 89% de los pacientes que sufrieron un TCE severo. Además, el TCE promueve disfunción autonómica que desempeña un papel sustancial en la sintomatología aguda que incluye dolor de cabeza, mareos, náuseas

y pérdida del balance y la postura (Purkayastha et al., 2019; Zygun et al., 2005).

Los efectos sistémicos están mediados por las cascadas deletéreas desencadenadas por la lesión secundaria post-TCE, disfunción del sistema nervioso autónomo (SNA) y la neuroinflamación. De hecho, el TCE induce una respuesta de estrés sistémico que se asocia con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y el sistema nervioso simpático, que promueven la liberación de glucocorticoides y catecolaminas que se mantiene por alrededor de 14 días (Griesbach et al., 2011; Kôiv et al., 1997; Rosner et al., 1984).



**Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos de la lesión secundaria post-TCE.** A) Excitotoxicidad. La liberación excesiva de glutamato y la disminución en la liberación de GABA desregula el balance que existe entre la transmisión excitatoria e inhibitoria que se ve incrementado por la disminución de los transportadores de glutamato en los astrocitos y el incremento de ATP extracelular. B) Neuroinflamación. La liberación de citocinas inflamatorias dentro del parénquima cerebral esta mediada por el reclutamiento de células circulantes del sistema inmune y la activación de la microglía aunado al incremento de la proteína S100A9. C) Los requerimientos energéticos de las células en el sistema nervioso central conllevan a una disfunción de la cadena respiratoria que contribuye a la generación de ROS. El incremento en las ROS ocasiona la lipoperoxidación de la membrana y la producción de 4-hidroxi-2-nonenal que contribuye a la formación de agregados de  $\alpha$ -sinucleína. D) Alteraciones de la unidad neurovascular. Se altera la hemodinámica cerebral por déficit en la función de los canales Kir 2.1 y activación de los canales BK<sub>Ca</sub> por una vía dependiente de ROS y TRPV4. La producción de ROS contribuye al incremento de la permeabilidad de la BHE, la redistribución y degradación de las proteínas asociadas a las uniones estrechas. ATP, adenosin-trifosfato;  $A\beta$ , proteína amiloide  $\beta$ ; BHE, barrera hematoencefálica; COX-2, cixlooxigenasa-2; CytC citocromo C; EAATs transportador de glutamato; FSC,

flujo sanguíneo cerebral; GABA, ácido  $\gamma$ -aminobutírico; IL- 6, interleucina 6; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 $\beta$ ; IL-8, interleucina 8; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; P2Y1R, receptor P2Y1; PDC, complejo piruvato deshidrogenasa; PgP, glicoproteína P; p-Tau, proteína tau fosforilada; RNS, especies reactivas de nitrógeno; ROS, especies reactivas de oxígeno; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; ZO-1, proteína zónula occludens 1. Figura creada con Biorender.com

### **1.2. Sistema cardiovascular**

El sistema cardiovascular tiene dos componentes principales: el corazón y los vasos sanguíneos. El corazón puede considerarse como una bomba cuya función es eyectar la sangre a la circulación pulmonar para que sea oxigenada, y a la circulación sistémica para distribuir la sangre por todo el organismo. Mientras que los vasos sanguíneos funcionan como conductos ramificados y distensibles que distribuyen la sangre por todo el cuerpo (Evans, 2013). El sistema linfático forma parte del sistema cardiovascular, y aunque no transporta sangre cumple con una función de transporte, intercambio y control del líquido intersticial (Klabunde, 2012). El sistema cardiovascular desempeña distintas funciones en el organismo que incluyen (Evans, 2013):

- a) Transporte de nutrientes esenciales para el metabolismo celular, oxígeno hacia las células y de desechos metabólicos, agua e iones para su posterior excreción.
- b) Regulación hormonal y de la temperatura. La sangre del sistema cardiovascular transporta a las hormonas desde su lugar de síntesis hacia los distintos tejidos donde desempeñan sus funciones. Por otra parte, el control de la temperatura se logra por desviación de la sangre desde vasos profundos hacia los superficiales, o viceversa.
- c) Protección contra agentes patógenos y pérdida de sangre por lesión. Esta función se logra ya que en el sistema circulatorio viajan las células del sistema inmune, los antígenos y mediadores de la coagulación que protegen a nuestro cuerpo.

### **1.2.1. Componentes y sus funciones**

#### **1.2.1.1. El corazón**

El corazón funciona como una bomba que pone a la sangre en circulación. La circulación sistémica comprende los vasos sanguíneos dentro y fuera de los órganos, a excepción de los pulmones que se denomina circulación pulmonar (Broadley, 1996). El corazón se divide en cuatro cámaras que incluyen a las aurículas (en la parte superior) y los ventrículos (en la parte inferior), tanto izquierdos como derechos. Del lado derecho se recibe la sangre venosa que es bombeada hacia la circulación pulmonar para su oxigenación en los alveolos. Por otra parte, la sangre que sale de los pulmones llega a la aurícula izquierda a través de la vena pulmonar y es eyectada por el ventrículo izquierdo hacia la aorta. La aorta se encarga de distribuir la sangre hacia todos los órganos por medio de las arterias (Evans, 2013; Klabunde, 2012).

La función del corazón se expresa generalmente como gasto cardíaco y se refiere a la cantidad de sangre que se eyecta por cada contracción multiplicada por la frecuencia cardíaca. Por lo que, tanto la frecuencia cardíaca como el volumen sistólico regulan la cantidad de oxígeno, y en consecuencia, la cantidad de trabajo del corazón (King y Bhimji, 2018). A su vez, la frecuencia cardíaca se determina por las células marcapasos del corazón, y la actividad de éstas se puede modificar por influencia del sistema nervioso autónomo o algunas hormonas como la adrenalina o la angiotensina (Klabunde, 2012).

#### **1.2.1.2. Los vasos sanguíneos**

Los vasos sanguíneos representan conductos distensibles y ramificados con dimensiones variables. Los vasos sanguíneos comprenden principalmente arterias, venas y capilares que se van ramificando, y desempeñan funciones de distribución, almacenamiento e intercambio.

Las paredes de la mayoría de los vasos sanguíneos están compuestas por 3 capas diferentes que incluyen: la capa íntima, la capa media y la capa adventicia. La capa íntima está compuesta por células endoteliales y se encuentra en contacto directo con la sangre. La capa media contiene células del músculo liso vascular (MLV) alojadas en una matriz de colágeno, elastina y glicoproteínas. Las células del MLV se encuentran organizadas de tal manera que su contracción reduce el diámetro de la luz del vaso sanguíneo; mientras que la cantidad de MLV, colágeno y elastina determina las propiedades mecánicas de cada vaso. Por último, la capa adventicia contiene colágeno, fibroblastos, adipocitos, los vasos sanguíneos de los vasos grandes, nervios linfáticos y autonómicos, y se encarga de dar estructura a la pared vascular, así como de la regulación del tono vascular (Stenmark et al., 2013).

La aorta es el principal vaso sanguíneo y se encarga de distribuir la sangre desde el corazón hacia todo el organismo. La aorta se ramifica en arterias grandes para distribuir el flujo sanguíneo hacia los distintos órganos o regiones específicas del cuerpo. Las arterias grandes como la arteria carótida, mesentérica y renal tienen la capacidad de relajarse o contraerse, pero no contribuyen de manera importante a la regulación de la presión arterial o el control del flujo sanguíneo bajo condiciones fisiológicas. De hecho, las arterias grandes se ramifican en arterias pequeñas que distribuyen la sangre dentro de los órganos, y que se van ramificando en vasos más pequeños denominados arteriolas que alcanzan diámetros menores a 200  $\mu\text{m}$ . Las arterias pequeñas y las arteriolas son considerados vasos de resistencia y son los encargados de la regulación de la presión arterial (Klabunde, 2012). A medida que las arteriolas se vuelven más pequeñas ( $< 10 \mu\text{m}$ ) pierden su capa de músculo liso y son denominados capilares sanguíneos. Estos capilares están compuestos únicamente de células endoteliales y son el principal sitio de intercambio de nutrientes y desechos metabólicos (Evans, 2013; Klabunde, 2012).

### **1.2.2. El sistema nervioso autónomo como regulador del sistema cardiovascular**

El sistema nervioso autónomo es una rama del sistema nervioso periférico eferente y controla todas las funciones autonómicas, es decir, aquellas sobre las que no tenemos una regulación consciente. El sistema nervioso autónomo está conformado por nervios, ganglios y plexos que se encuentran distribuidos en todo el cuerpo y que inervan al corazón, vasos sanguíneos, glándulas, vísceras y músculo liso en varios tejidos. El sistema nervioso autónomo se clasifica en sistema nervioso simpático y sistema nervioso parasimpático (Westfall & Westfall, 2022).

Los vasos sanguíneos se pueden contraer o relajar para alterar su diámetro y regular la presión arterial, el flujo sanguíneo dentro de los órganos, la presión en los capilares, y distribuir la sangre dentro del cuerpo. Los cambios en el diámetro de los vasos sanguíneos se presentan por activación del MLV y dependen de la actividad de los nervios autonómicos, señales bioquímicas y metabólicas, o sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio vascular o el tejido adiposo perivascular (Chang et al., 2020; Félétou & Vanhoutte, 2013; Klabunde, 2012; Tortora & Derrickson, 2013).

Los vasos sanguíneos de resistencia que regulan la presión arterial se encuentran altamente inervados por el sistema nervioso autónomo, particularmente el sistema nervioso simpático adrenérgico. Por tanto, los vasos sanguíneos se contraen o se relajan en función de los cambios en la actividad de las terminaciones simpáticas. Además, los vasos sanguíneos tienen una alta expresión de receptores a hormonas circulantes como la adrenalina y la angiotensina II. El tono vascular también responde a distintas sustancias sintetizadas por el tejido que rodea el vaso (por ejemplo, adenosina), por el endotelio vascular (óxido nítrico, entre otros), o a la modulación por distintos canales iónicos (Godo & Shimokawa, 2017; Klabunde, 2012).

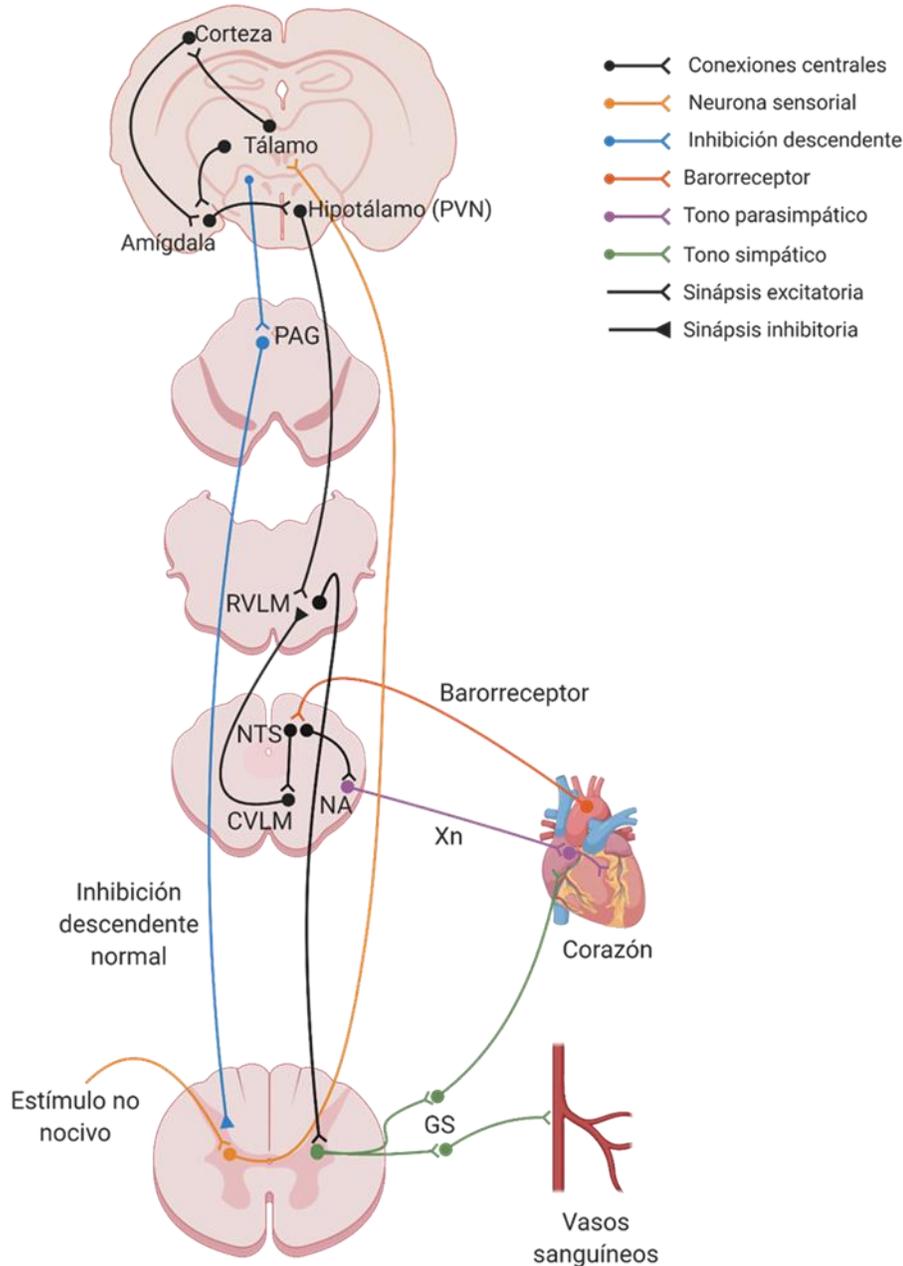
El sistema nervioso autónomo en el corazón modula la frecuencia cardiaca (cronotropismo), la velocidad de conducción (dromotropismo), fuerza de contracción (inotropismo) y la relajación (lusitropismo). La estimulación del sistema nervioso simpático induce respuestas cronotrópicas y dromotrópicas positivas; mientras que, el sistema nervioso parasimpático ejerce el efecto opuesto, es decir, respuestas cronotrópicas y dromotrópicas negativas. Además, la actividad del sistema nervioso simpático induce efectos inotrópicos y lusitropicos, debido a que los ventrículos y las aurículas tienen principalmente inervación de este sistema (Dampney, 2016). La división simpática del sistema nervioso autónomo inerva la adventicia de la mayoría de las arterias y arteriolas del organismo. El incremento del tono simpático induce respuestas contráctiles mientras que su disminución ejerce el efecto opuesto.

### **1.2.2.1. Estructuras centrales que regulan el sistema nervioso autónomo**

El sistema nervioso autónomo tiene su origen a nivel central en el núcleo paraventricular en el hipotálamo, y el núcleo del tracto solitario, la médula ventrolateral (caudal y rostral) y el núcleo ambiguo en el tallo cerebral. La función del sistema cardiovascular está mediada principalmente por el reflejo barorreceptor.

Los barorreceptores se encuentran localizados en el seno carotídeo y el cayado aórtico. Los barorreceptores son receptores de estiramiento que detectan cambios en la distensibilidad vascular y mandan la información sensorial hacia el sistema nervioso central. La frecuencia de disparo de los barorreceptores se envía hacia el núcleo del tracto solitario (NTS) a través de proyecciones aferentes. A su vez, el NTS tiene proyecciones excitatorias hacia el núcleo ambiguo (nAmb) y la médula caudal ventrolateral (CVLM). El nAmb da origen al nervio vago (sistema nervioso parasimpático); mientras que, la CVLM regula la actividad de la médula

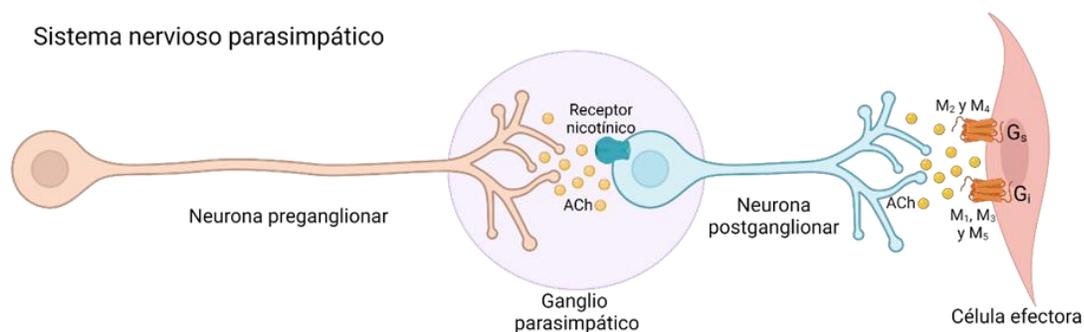
rostral ventrolateral (RVLM), también conocido como el centro vasomotor, a través de conexiones inhibitorias. Además, las neuronas provenientes de la RVLM hacen sinapsis con las neuronas preganglionares del sistema nervioso simpático en el núcleo intermediolateral de la médula espinal. De ahí que, cuando se incrementa la presión arterial, los barorreceptores estimulan al NTS que, a su vez, activa a la CVLM y al nAmb conllevando a una estimulación vagal y una disminución de la actividad de la RVLM (Dampney, 2016; McCorry, 2007). En otras palabras, el aumento de la presión activa al sistema nervioso parasimpático e inhibe al sistema nervioso simpático, lo que conlleva al restablecimiento de la presión arterial. Además, la RVLM también recibe información de estructuras corticales como la región insular y medial prefrontal; y subcorticales como el tálamo, hipotálamo, amígdala, entre otros. Adicionalmente, las vías inhibitorias descendientes provenientes del tálamo y la sustancia gris periacueductal dorso lateral (dIPAG) regulan la respuesta eferente ante estímulos no nocivos (Dampney, 2016) (Figura 2).



**Figura 2. Regulación del sistema cardiovascular a nivel central por el reflejo barorreceptor.** El sistema cardiovascular recibe inervación del sistema nervioso autónomo que se regula a nivel central en estructuras como el hipotálamo y el tallo cerebral. La información de la presión arterial se recibe al núcleo del tracto solitario a través de los barorreceptores. El NTS manda información hacia la CVLM para regular a la RVLM y al NA para regular al nervio vago. A su vez, la RVLM recibe información de estructuras superiores que modulan al sistema cardiovascular con base en los estímulos externos. El tálamo recibe información sensorial no nociva y, a través del PAG, modula la inhibición descendente. PVN, núcleo paraventricular; PAG, sustancia gris periacueductal; RVLM, médula rostral ventrolateral; NTS, núcleo del tracto solitario; CVLM, médula caudal ventrolateral; NA, núcleo ambiguo; Xn, par craneal X, nervio vago; GS, ganglio simpático. Figura creada con Biorender.com

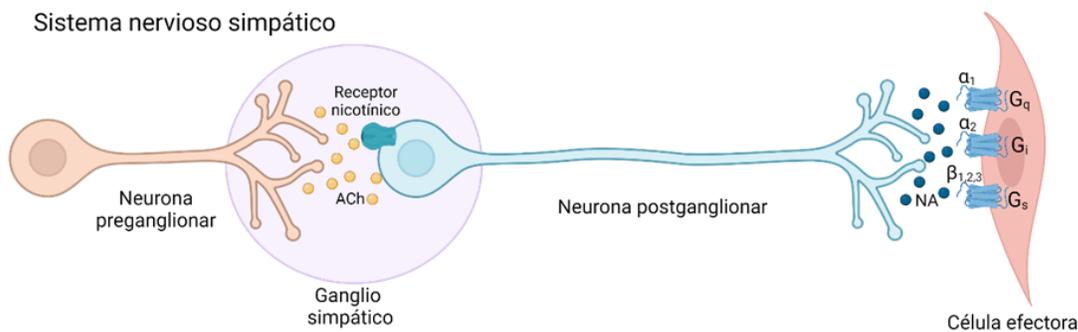
### 1.2.2.2. Sistema nervioso autónomo simpático y parasimpático

El sistema nervioso parasimpático se origina a nivel de los pares craneales y de las vértebras sacrales. El sistema parasimpático tiene fibras preganglionares largas y fibras posganglionares cortas con una relación 1:1, por lo que produce respuestas localizadas. Tanto las neuronas pre- como posganglionares liberan acetilcolina (ACh), la diferencia radica en el tipo de receptores que activan. Por ejemplo, la ACh liberada por la fibra preganglionar se une a los receptores nicotínicos localizados en la fibra posganglionar; mientras que esta última libera ACh que activa a receptores muscarínicos en el órgano efector. Los receptores muscarínicos pueden ser tipo M1, M2, M3, M4 o M5. Los receptores M1, M3 y M5 están acoplados a proteínas Gq; mientras que los receptores M2 y M4 están acoplados a proteínas Gi (Figura 3). Los vasos sanguíneos de resistencia carecen de inervación parasimpática (Katzung, 2013).



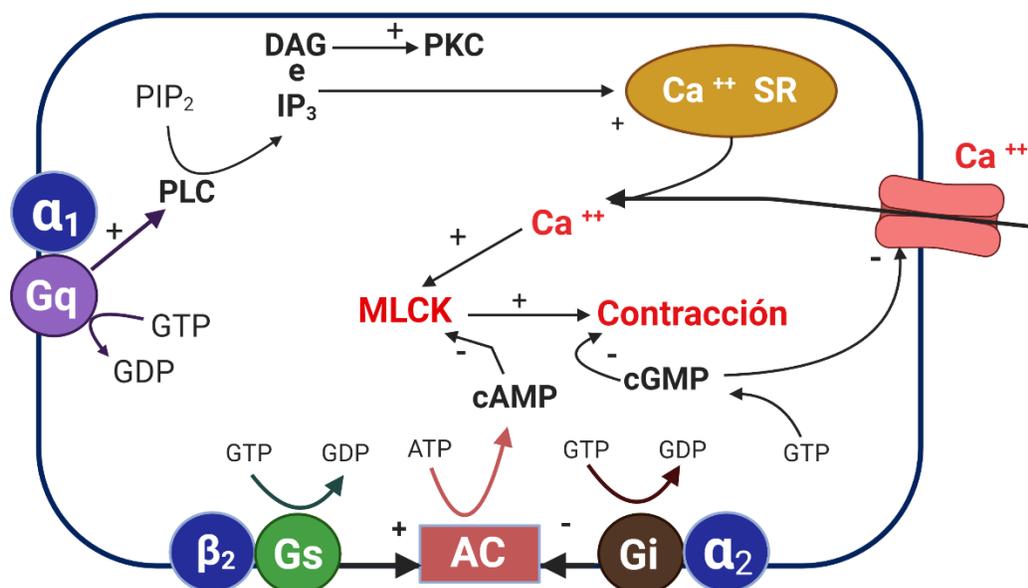
**Figura 3. Características del sistema nervioso parasimpático.** La neurona preganglionar libera ACh que se une a receptores nicotínicos en la neurona posganglionar. La neurona posganglionar libera ACh que se une a receptores muscarínicos en la célula efectora. ACh, acetilcolina. Figura creada con Biorender.com

Por otra parte, el sistema nervioso simpático tiene su origen a nivel de las vértebras torácicas y lumbares y presenta fibras preganglionares cortas con fibras posganglionares largas. En el caso del sistema simpático, la relación de las fibras es 1:20 o más, por lo que genera respuestas generalizadas. Al igual que el sistema parasimpático, las fibras preganglionares del sistema nervioso simpático libera ACh que se une a los receptores nicotínicos localizados en la fibra posganglionar. Las fibras posganglionares del sistema simpático pueden liberar noradrenalina en los vasos sanguíneos de resistencia, ACh en los vasos sanguíneos del músculo esquelético o dopamina en la arteria renal (Westfall & Westfall, 2022) (Figura 4).



**Figura 4. Características del sistema nervioso simpático.** La neurona preganglionar libera ACh que se une a receptores nicotínicos en la neurona posganglionar. La neurona posganglionar libera ACh que se une a receptores adrenérgicos en la célula efectora. SN, Sistema Nervioso; ACh, acetilcolina; NA, noradrenalina. Figura creada con Biorender.com

La noradrenalina liberada por las fibras simpáticas se une a los receptores adrenérgicos localizados en el vaso sanguíneo de resistencia. Los receptores adrenérgicos pueden ser de tipo α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>, o β<sub>3</sub>, y cada uno está acoplado a una proteína G que modula su efecto en el MLV (Aburto et al., 1993; Cotecchia, 2010) (Figura 5).



**Figura 5. Receptores adrenérgicos y mecanismos de transducción de señales.** Los receptores  $\alpha_1$  están acoplados a la proteína Gq y median respuestas contráctiles por activación de la enzima PLC que hidroliza el  $PIP_2$  en DAG e  $IP_3$  promoviendo la salida de calcio del SR. Los receptores  $\alpha_2$  están acoplados a Gi e inducen respuestas contráctiles por inhibición de la AC. Los receptores  $\beta$  adrenérgicos inducen relajación por activación de la AC. PLC, fosfolipasa C;  $PIP_2$ , 4,5-bifosfato de fosfatidil-inositol; DAG, diacil-glicerol;  $IP_3$ , 1,4,5-trifosfato de inositol; SR, retículo sarcoplásmico; AC, adenilato ciclasa. Figura creada con Biorender.com

### 1.3. Sulfuro de hidrógeno

#### 1.3.1. Generalidades

Los gasotransmisores son moléculas gaseosas cuyos efectos no dependen de receptores de membrana. Los miembros de la familia de los gasotransmisores deben cumplir con 6 características (Tabla 1) (Wang, 2002, 2014).

**Tabla 1. Características de los gasotransmisores**

1) Ser una molécula gaseosa pequeña
2) Ser capaz de atravesar libremente las membranas de las células
3) Ser producido de manera endógena en las células de los mamíferos
4) Poseer funciones específicas bien definidas y concentraciones fisiológicas relevantes.
5) La aplicación de donadores exógenos induce efectos similares a los del gasotransmisor endógeno
6) Participar en la transducción de señales y tener blancos celulares y moleculares específicos

El sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), el más simple de los tioles encontrados en las células, es el miembro más reciente de la familia de los gasotransmisores, en la que también se encuentran el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) (Mustafa et al., 2009; Wang, 2002, 2003). Acorde con esos criterios, la identidad del  $H_2S$  como miembro de la familia se validó en el 2002 ya que cumplía con las características de los gasotransmisores que a continuación se enlistan (Wang, 2002, 2014):

- ✓ El  $H_2S$  es una molécula gaseosa pequeña que una vez producida es parcialmente disuelto en su forma libre o parcialmente disociado.
- ✓ El  $H_2S$  permea libremente a través de las membranas plasmáticas.
- ✓ El  $H_2S$  es generado enzimáticamente en las células de los mamíferos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.
- ✓ El  $H_2S$  desempeña funciones específicas bien definidas a concentraciones fisiológicas relevantes. En este sentido, los efectos del  $H_2S$  se han caracterizado amplia y concretamente en el sistema cardiovascular, el sistema nervioso, el sistema respiratorio, el sistema gastrointestinal, entre otros. Además, la concentración fisiológica del  $H_2S$  y sus funciones son relevantes, ya que modificaciones de los niveles endógenos de  $H_2S$  se correlacionan con cambios funcionales en distintos sistemas.
- ✓ Para el estudio de la función del  $H_2S$  se emplean herramientas farmacológicas donadores exógenos de  $H_2S$ . La aplicación de dichos donadores induce efectos similares a los del  $H_2S$  que se produce de manera endógena en diferentes sistemas biológicos.

### **1.3.2. Historia**

Los inicios de la historia del  $H_2S$  se remontan hacia 1700 con las observaciones de Bernardino Ramazzini, el padre de la medicina

ocupacional, quien describió la inflamación e irritación de los ojos que presentaban los trabajadores del alcantarillado y que asoció con el “gas de las alcantarillas” (Felton, 1997). La enfermedad de los trabajadores del alcantarillado se extendió por París en 1770 cuando se empezó a emanar gas por todo el sistema de alcantarillado del país. El H<sub>2</sub>S fue sintetizado químicamente y por primera vez, en 1775, a partir de sulfuro ferroso (pirita) con ácido mineral (Nicholls & Kim, 1981), pero fue hasta 1806 cuando se confirmó la presencia de este gas en el sistema de alcantarillado (Dupuytoren, 1806). Desde entonces el “gas de las alcantarillas” pasó a ser conocido como H<sub>2</sub>S desencadenando una serie de estudios en torno a su toxicología.

En este sentido, la administración de soluciones ricas en H<sub>2</sub>S produce efectos tóxicos que van desde depresión respiratoria, convulsiones y hasta la muerte (Szabo, 2017). Además, se observó que la administración por vía intravenosa de donadores de H<sub>2</sub>S inducía un cambio en la coloración de la sangre debido a la reacción con la hemoglobina y la producción de sulfohemoglobina (Mitchell & Davenport, 1924). Dentro de los próximos 150 años se realizaron diversos estudios respecto a los efectos toxicológicos del H<sub>2</sub>S en varias especies incluyendo humanos (Beauchamp et al., 1984; Chou et al., 2016; Mitchell & Davenport, 1924; Szabo, 2017).

Actualmente, se sabe que los efectos letales del H<sub>2</sub>S se deben a la inhibición del complejo IV mitocondrial (citocromo C oxidasa). En otras palabras, el H<sub>2</sub>S impide que las células sean capaces de “respirar” de forma adecuada, limitando la producción de energía en forma de ATP.

El desarrollo de la historia del H<sub>2</sub>S dio un cambio radical en 1989 cuando se desarrolló un estudio toxicológico para determinar la cantidad de H<sub>2</sub>S que llegaba al tejido cerebral tras la administración intraperitoneal de NaHS, un donador de H<sub>2</sub>S, en ratas. De manera sorprendente, el grupo de trabajo de Goodwin encontró niveles considerables de H<sub>2</sub>S en las

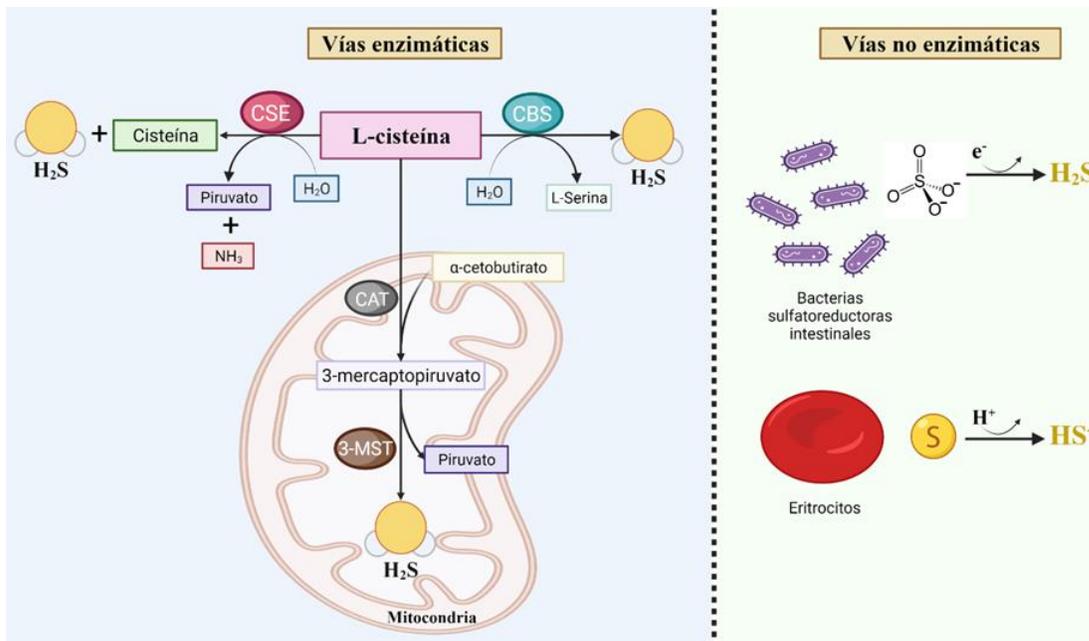
ratas control que no habían recibido la administración del donador (Goodwin et al., 1989; Warencicia et al., 1989). Este hallazgo inesperado permitió especular sobre el papel de H<sub>2</sub>S producido de manera endógena, pero fue hasta 1996 cuando Abe y Kimura demostraron el efecto neuromodulador del H<sub>2</sub>S (Abe & Kimura, 1996).

Respecto a la síntesis de H<sub>2</sub>S, la enzima cistationina-β-sintetasa (CBS) se encontró por primera vez en tejido cerebral en 1996 (Abe & Kimura, 1996). Posteriormente, se descubrió que la cistationina-γ-liasa (CSE) era capaz de producir H<sub>2</sub>S en el hígado, riñón, aorta e íleon de cobayo (Finkelstein, 1990; Ishii et al., 2004), y que el H<sub>2</sub>S producido en esos tejidos inducía efectos relajantes sobre el músculo liso (Dombkowski et al., 2004; Zhao et al., 2001; Hosoki et al., 1997). Por otra parte, en homogenados de cerebro de ratones con delección para la enzima CBS, se encontró que las enzimas 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST) y cistationina-amino transferasa (CAT) estaban involucradas en la biosíntesis del H<sub>2</sub>S (Cooper, 1983; Shibuya et al., 2009; Taniguchi & Kimura, 1974; Ubuka et al., 1978).

### **1.3.3. Síntesis**

El H<sub>2</sub>S se sintetiza endógenamente a partir del aminoácido L-Cisteína (L-Cis) a través de 3 vías enzimáticas que incluyen: (1) la cistationina-β-sintetasa (CBS); (2) la cistationina-γ-liasa (CSE); y (3) la 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST) en conjunto con la cistationina-amino transferasa. Aparte de la producción endógena por vías enzimáticas, las concentraciones plasmáticas de H<sub>2</sub>S dependen de bacterias sulfato-reductoras localizadas en el intestino (Shen et al., 2013). Dichas células generan H<sub>2</sub>S a través del metabolismo de la glucosa, polisulfuros y aminoácidos que contienen grupos sulfuro. Además, los eritrocitos también pueden convertir el azufre elemental en HS<sup>-</sup> por reducción no enzimática (Olson et al., 2013; Searcy & Lee, 1998; Yang et al., 2019) (Figura 6).

La CBS es una enzima citosólica y depende de piridoxal-5-fosfato. La actividad de la enzima CBS involucra una reacción de condensación entre la L-Cis y la homocisteína para generar cistationina (Chen et al., 2004). La enzima CBS se expresa en tejidos como el hígado, el riñón, el páncreas, el íleon y el cerebro (Kimura, 2014). Dentro de este último, la expresión de la enzima CBS se ha reportado principalmente en astrocitos (Enokido et al., 2005; Ichinohe et al., 2005) y microglía (Hu et al., 2007). Al igual que la enzima CBS, la enzima CSE es citosólica y su actividad depende de piridoxal-5-fosfato. La enzima CSE cataliza la conversión de L-Cis a piruvato, tiocisteína y amonio con liberación de H<sub>2</sub>S (Chiku et al., 2009). La expresión de la enzima CSE se ha reportado en el hígado, el riñón, la aorta, el íleon, la vena porta, el corazón y, en menor medida, en tejido cerebral (Fu et al., 2012; Kimura, 2014; Paul et al., 2014). La última de las vías enzimáticas involucra tanto a la enzima 3-MST como a la enzima CAT. La actividad de la 3-MST no depende de piridoxal-5-fosfato y se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria. En esta vía, la enzima CAT produce 3-mercaptopiruvato y  $\alpha$ -cetoglutarato a partir de la L-Cis. Posteriormente, la enzima 3-MST permite la conversión de 3-mercaptopiruvato a piruvato más H<sub>2</sub>S (Shibuya et al., 2009). La expresión de la enzima 3-MST se ha encontrado principalmente en el endotelio vascular y en el cerebro. Dentro del tejido cerebral, la expresión de la enzima 3-MST se limita a las neuronas (Shibuya et al., 2009).



**Figura 6. Biosíntesis de sulfuro de hidrógeno.** El sustrato para la producción de H<sub>2</sub>S es la L-cisteína. El H<sub>2</sub>S producido por la CBS está asociado con la condensación de homocisteína con L-cisteína para producir cistationina y H<sub>2</sub>S. La CSE cataliza el paso de L-cisteína a piruvato, amonio y tiocisteína. La tiocisteína se degrada a cisteína y H<sub>2</sub>S. 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<sub>2</sub>S y disulfuro de glutatión. CSE, Cistationina-β-liasa; CBS, Cistationina-γ-sintasa; CAT, Cistationina-amino transferasa; 3-MST, 3-mercaptopiruvato-sulfur-transferasa. Figura creada con Biorender.com

### 1.3.4. Persulfuración de proteínas

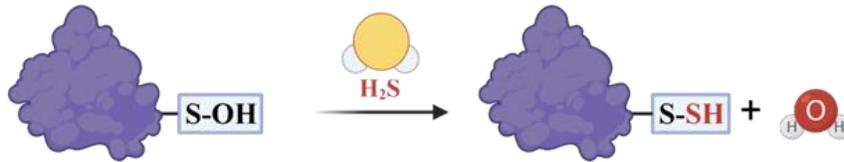
Una vez que el H<sub>2</sub>S es sintetizado, este gasotransmisor regula diversas vías de señalización, canales iónicos y enzimas a través de un proceso denominado persulfuración de proteínas (Paul & Snyder, 2015a). La persulfuración es un fenómeno similar a la nitrosilación e involucra la interacción del H<sub>2</sub>S con residuos de cisteína oxidados (Paul & Snyder, 2015a). La persulfuración mediada por H<sub>2</sub>S puede ocurrir por 3 mecanismos: (1) 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-); (2) una reacción entre una especie de sulfuro oxidada, como los polisulfuros, y el grupo tiol de la cisteína; o (3)

la reacción de disulfuro de hidrógeno ( $H_2S_2$ ) con el grupo tiol de la cisteína (Figura 7) (Paul & Snyder, 2015a, 2015b). La persulfuración, así como la nitrosilación, se revierte enzimáticamente por las enzimas tioredoxina/tioredoxina reductasa (Benhar et al., 2009; Krishnan et al., 2011).

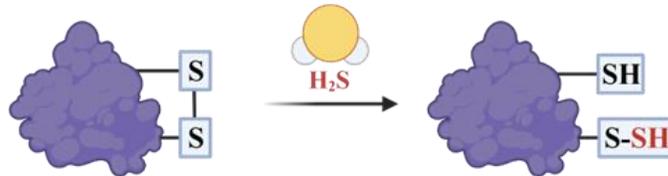
### **1.3.5. Metabolismo**

Una vez que el  $H_2S$  ha ejercido sus efectos, éste se puede metabolizar por 3 vías diferentes (Figura 8). La primera vía es a través de reacciones óxido/reducción que se llevan a cabo en la mitocondria. En esta vía, el  $H_2S$  es convertido en tiosulfato, mismo que posteriormente se convierte en sulfito y finalmente es eliminado como sulfato. El sulfato representa el principal producto final del metabolismo del  $H_2S$  (Hideo Kimura, 2012). Por lo anterior, la concentración de tiosulfato en la orina está considerada como un marcador específico de la síntesis de  $H_2S$  en el organismo (Yu et al., 2014). La segunda vía de metabolismo esta mediada por la enzima tiol-S-metiltransferasa que cataliza la conversión de  $H_2S$  a dimetilsulfuro. La última de las vías descrita es la reacción del  $H_2S$  con la hemoglobina, lo que conlleva a la formación de sulfohemoglobina (Kimura, 2013).

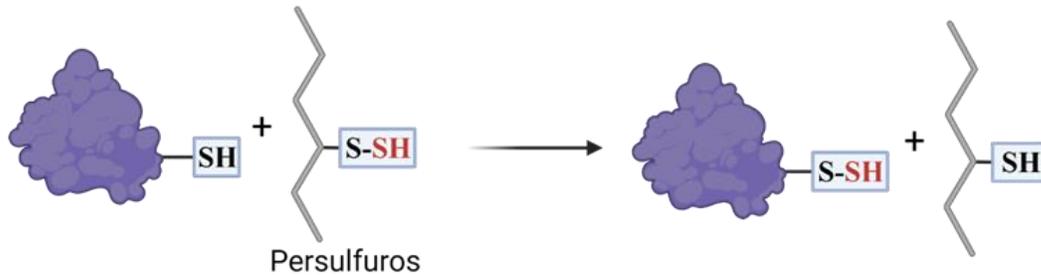
**Reacción 1**



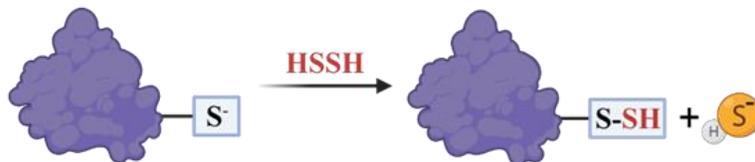
**Reacción 2**



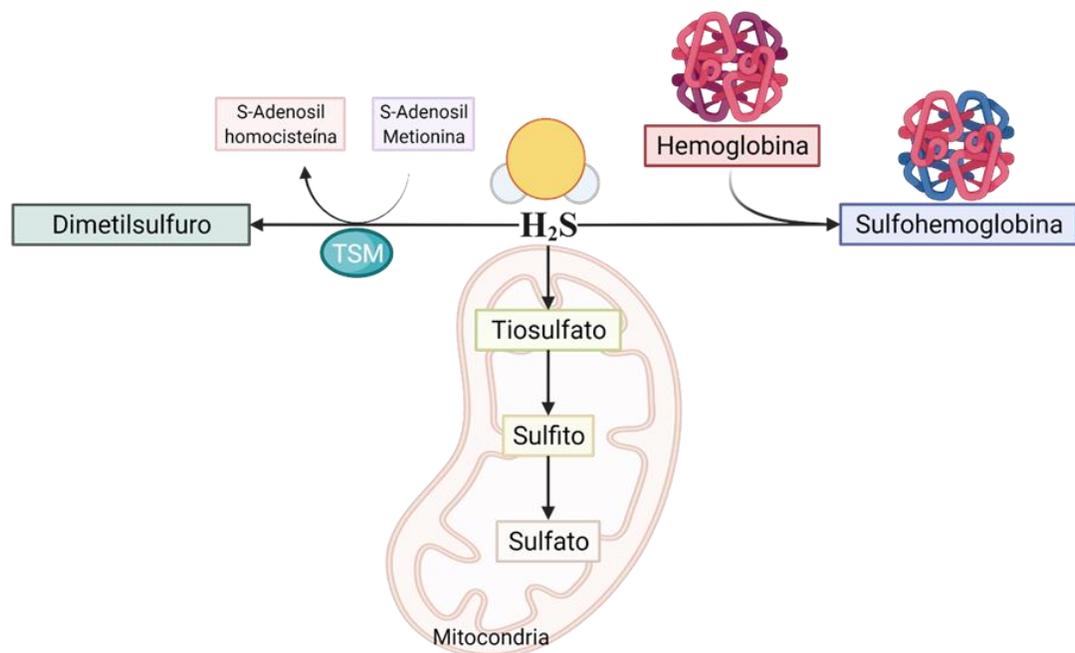
**Reacción 3**



**Reacción 4**



**Figura 7. Mecanismos de persulfuración de proteínas.** La persulfuración puede ocurrir por la reacción en el sulfuro con residuos de cisteína oxidada (Reacción 1 y Reacción 2). También puede ocurrir cuando un persulfuro existente reacciona con un tiol-cisteína (Reacción 3). La reacción de H<sub>2</sub>S<sub>2</sub> con tiolatos de cisteína también puede llevar a persulfuración (Reacción 4). Figura creada con Biorender.com y modificada de (Paul & Snyder, 2015a)



**Figura 8. 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 sulfhemoglobina. TSM, tiol-S-metiltransferasa. Figura creada con Biorender.com

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Disfunción autonómica post-TCE

Como se mencionó previamente, el reflejo barorreceptor es un regulador clave de la función cardiovascular. Por tanto, cualquier daño en la señalización del reflejo barorreceptor, descrita anteriormente, tiene repercusiones importantes en el sistema cardiovascular y la regulación de la presión arterial. En este sentido, se sugiere que las alteraciones autonómicas observadas después del TCE son consecuencia del daño a las estructuras centrales que regulan al sistema nervioso autónomo (Goldstein et al., 2017).

Existen diferentes hipótesis que tratan de explicar el mecanismo que subyace a la disfunción autonómica observada después de un TCE. La primera teoría, conocida como “teoría de la desconexión”, intenta explicar la disautonomía a través del daño al hipotálamo. Esta condición fue nombrada inicialmente como “convulsiones diencefálicas autonómicas” ya que se encontró daño hipotalámico en la autopsia de un paciente con episodios agudos de disfunción autonómica (Penfield, 1929). Sin embargo, no se encontró evidencia de actividad epileptiforme en el electroencefalograma durante los episodios de disautonomía y los fármacos anticonvulsivantes no eran eficaces contra estos episodios (Boeve et al., 1998). Hoy en día, se sabe que la “desconexión” ocurre en respuesta al daño mecánico (lesión axonal difusa), así como por alteraciones en la neurotransmisión (Baguley et al., 2006). A pesar de que esta teoría ha evolucionado con el paso de los años, lo cierto es que la disfunción autonómica ocurre después del daño hipotalámico agudo inducido por el TCE, tal y como está reportado en estudios clínicos (Baguley et al. 2006; Dolce et al. 2008; De Tanti et al. 2005; Thorley et al. 2001) y preclínicos (Tümer et al., 2013).

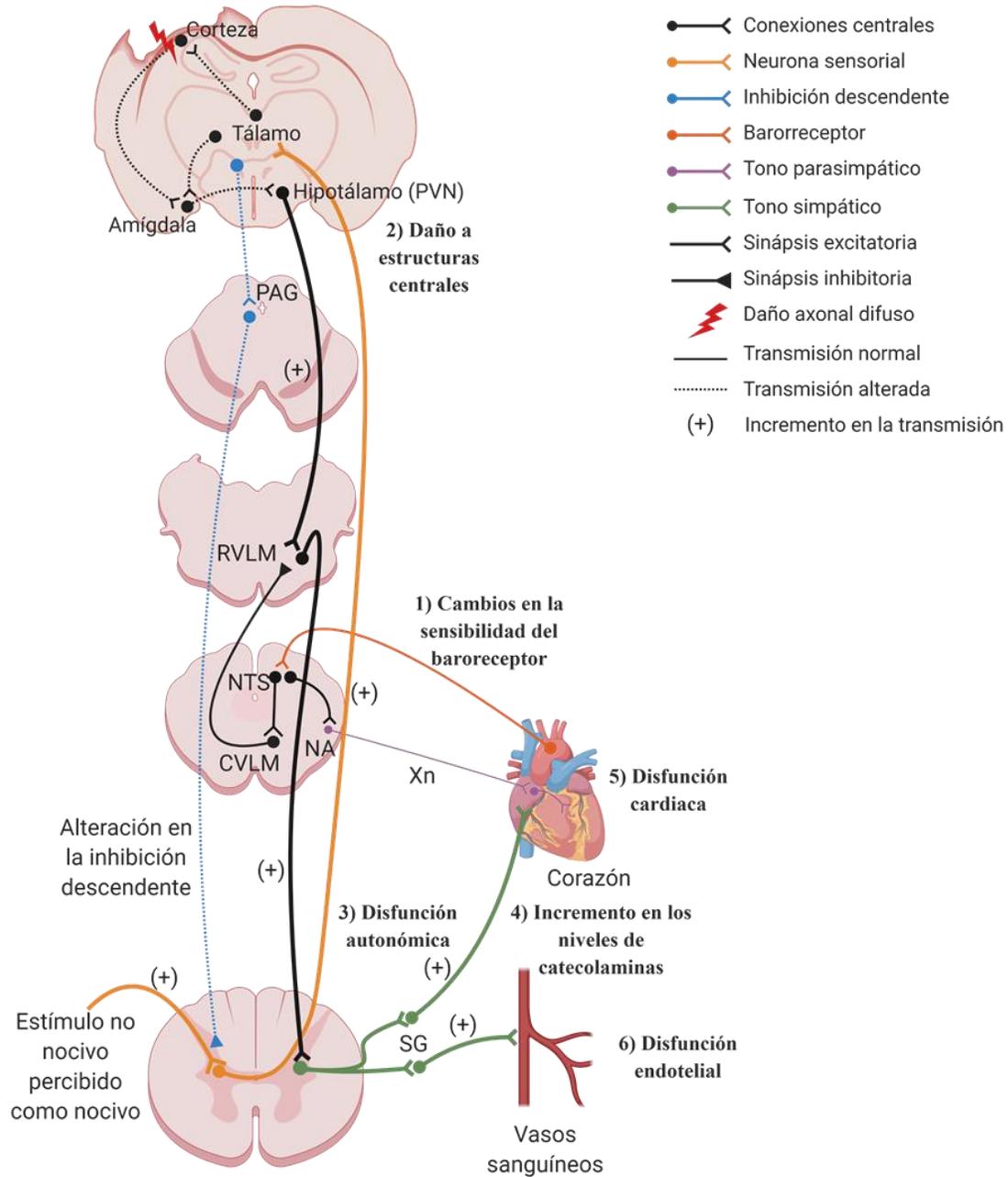
Por otra parte, el modelo de la relación inhibición: excitación es un modelo más integrativo que involucra estructuras tanto espinales como supraespinales. Esta hipótesis sugiere que las vías de inhibición descendente que vienen desde el tálamo y la sustancia gris periacueductal se pierden después del TCE.

El modelo de la relación inhibición: excitación se basa en un incremento en los neurotransmisores excitadores y una disminución de los neurotransmisores inhibidores en la médula espinal. Este desbalance de la relación inhibición: excitación conlleva a percibir estímulos no nocivos como nocivos promoviendo una integración de la información sensorial anormal en centros supraespinales como el tálamo. En respuesta a este déficit en la integración sensorial, se presenta una alteración en el control descendente inhibitorio que aumenta la información eferente del sistema nervioso simpático y las neuronas motoras (Baguley, 2008).

Los cambios cardiovasculares subsecuentes a un TCE son dinámicos y pueden ser breves o persistir a lo largo del tiempo. Particularmente, las alteraciones en el sistema nervioso autónomo después de un TCE se han observado en estudios clínicos y preclínicos como: (1) incremento en las catecolaminas circulantes (Fernandez-Ortega et al., 2017; Rosner et al., 1984; Tümer et al., 2013), (2) desregulación autonómica (Baguley et al., 2009; Bishop et al., 2017; Hilz et al., 2011; Umemoto et al., 2019; Wang et al., 2018); (3) hiperactividad simpática paroxística (PSH) (Lv et al., 2010), (4) cambios en la sensibilidad del reflejo barorreceptor (Baguley et al., 2006; Hilz et al., 2016; King et al., 1997; La Fontaine et al., 2009; McMahon et al., 2011); y (5) efectos en estructuras centrales como la RVLM o el PVN (Chen et al., 2019; Tümer et al., 2013) (Figura 9).

El TCE severo está asociado con un incremento de 500 veces en las concentraciones plasmáticas de adrenalina y de 100 veces en la noradrenalina en modelos experimentales (Rosner et al., 1984). Los incrementos en las catecolaminas se correlacionan con la severidad del TCE y los aumentos de la presión arterial sistólica. La elevación plasmática de catecolaminas subsecuente a un TCE en humanos ocurre inmediatamente después del trauma con un pico máximo a los 10-15 días post-TCE (Hörtnagl et al., 1980). Adicionalmente, la oleada de catecolaminas está relacionada con un estado cardiaco hiperdinámico (Clifton et al., 1981, 1983; Robertson et al., 1984). Por

tanto, se sugiere que la hiperactividad simpática y el incremento en las catecolaminas son responsables de los cambios cardiovasculares observados en pacientes con TCE.



**Figura 9. Alteraciones cardiovasculares post-TCE.** El TCE induce un incremento en la estimulación hipotalámica sobre la RVLM y una alteración en las vías descendentes inhibitorias a causa de la lesión axonal difusa. El TCE altera la sensibilidad de los barorreceptores (1) e induce daño en estructuras centrales como el hipotálamo y el tallo cerebral (2). Lo anterior promueve un incremento en el tono simpático (3) y liberación excesiva

de catecolaminas (4). Además, el TCE induce cambios sobre los órganos efectores, lo que promueve disfunción cardíaca (5) y endotelial (6). PVN, núcleo paraventricular; PAG, sustancia gris periacueductal; RVLM, médula rostral ventrolateral; NTS, núcleo del tracto solitario; CVLM, médula caudal ventrolateral; NA, núcleo ambiguo; Xn, par craneal X, nervio vago; GS, ganglio simpático. Figura creada con Biorender.com

Sin importar que estos cambios se sobrepongan o se presenten de manera independiente, las alteraciones autonómicas pueden resultar en una alteración de la función cardiovascular en la mayoría de los pacientes (Tabla 2). Sin embargo, sí la severidad del TCE impacta diferencialmente al sistema cardiovascular continúa siendo un tema de debate, ya que los estudios en animales son controversiales (McMahon et al., 2011; Rosner et al., 1984) y la literatura clínica actual sugiere que los cambios cardiovasculares dependen de la severidad del TCE en adultos (Hilz et al., 2017; Salim et al., 2008) pero no en niños (Loizou et al., 2010). Además, algunos ensayos clínicos sugieren que las alteraciones cardiovasculares post-TCE están asociadas con el pronóstico y la mortalidad de los pacientes (Dolce et al., 2008; Lv et al., 2010; Prathep et al., 2014); mientras que otros estudios muestran que no existe relación entre las dos condiciones (Loizou et al., 2010; Najafipour et al., 2014; Serri et al., 2016). Además, existen distintos modelos animales que se han empleado para estudiar los efectos del TCE sobre el sistema cardiovascular (Tabla 3)

**Tabla 2. Estudios clínicos que demuestran las alteraciones cardiovasculares post-TCE.**

Estudios clínicos						
Sujetos	Severidad del TCE	Tiempo de evaluación	Variables consideradas	Principales hallazgos	Conclusión	Referencia
32 pacientes con TCE	Moderado a severo	24 post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>ECG transtorácico y mediciones de PAS, PAM y FC cada hora durante las primeras 24 h posteriores al TCE</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los pacientes que desarrollaron disfunción sistólica (22%) tuvieron un perfil hemodinámico caracterizado por hipertensión y taquicardia temprana seguidas de una disminución en la PA</li> </ul>	El exceso de liberación de catecolaminas es un mecanismo subyacente a la disfunción sistólica post-TCE	(Krishnamoorthy et al., 2017)
420 pacientes	Moderado a severo	24-48 h posteriores de la admisión a la UCI	<ul style="list-style-type: none"> <li>Troponina sérica (cTnI): marcador bioquímico de lesión miocárdica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los pacientes con menor puntuación en la escala de coma de Glasgow tuvieron cTnI elevada</li> </ul>	Los niveles de cTnI correlacionan con la severidad del TCE y es un predictor del pronóstico	(Salim et al., 2008)
3 pacientes con contusión y 3 pacientes control	Leve (contusión relacionada con deportes)	48 h y 2 semanas post-contusión	<ul style="list-style-type: none"> <li>VFC y CFC en descanso y durante la prueba isométrica de "handgrip"</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La VFC no fue diferente entre el grupo control y el grupo con contusión en reposo o durante la prueba de "handgrip"</li> <li>La CFC fue significativamente menor en los pacientes con contusión a las 48 h pero no a las 2 semanas durante la prueba de "handgrip"</li> </ul>	La CFC puede ser de utilidad para detectar anomalías en la inervación autónoma cardíaca	(La Fontaine et al., 2009)
12 pacientes con TCE y 89 controles sanos	Leve (contusión relacionada con deportes)	Primeras 72 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Medición de la FC por ECG y PA (pletismógrafo) en reposo y realizando ejercicio</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los pacientes con contusión tuvieron menos desviación estándar en la frecuencia cardíaca durante el ejercicio y en reposo</li> </ul>	La disfunción autónoma se presenta a corto plazo en el TCE leve	(Bishop et al., 2017)

Sujetos	Severidad del TCE	Tiempo de evaluación	Variables consideradas	Principales hallazgos	Conclusión	Referencia
49 pacientes con TCE	Moderado a severo	4 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ECG</li> <li>• Fracción de eyección del ventrículo izquierdo y anomalías en las paredes cardíacas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ningún paciente tuvo disfunción ventricular</li> <li>• 8% de los pacientes tuvieron anomalías en las paredes sin cambios en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo</li> </ul>	La ausencia de disfunción miocárdica probablemente se debe a la edad de los pacientes o la ausencia de factores de riesgo cardiovascular	(Serri et al., 2016)
16 pacientes con TCE que presentaron excitación autonómica	Moderado a severo	7 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patrones de la VFC y alteraciones en la FC después de un estímulo nocivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se encontró una hiper-responsividad ante estímulos nocivos</li> </ul>	La desregulación autonómica se presenta como consecuencia de un fallo en el control de estímulos externos	(Baguley et al., 2009)
139 pacientes con TCE	Leve y moderado-severo	Los primeros 14 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ECG</li> <li>• Fracción de eyección del ventrículo izquierdo y anomalías en las paredes cardíacas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 22.3% mostró anomalías en el ECG</li> <li>• 12% mostró disminución en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo</li> <li>• 17.5% tuvo alteraciones en las paredes</li> </ul>	La disfunción cardíaca en pacientes con TCE está asociada con una mayor mortalidad hospitalaria	(Prathep et al., 2014)
20 pacientes con TCE y 20 personas sanas	Leve	20 ± 11 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respiración, intervalo R-R y mediciones de la PA de pie y en posición supina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En posición supina, los pacientes con TCE tuvieron una disminución en la SRB y modulación cardio-vagal</li> <li>• De pie, la SRB se encontró disminuida y la modulación no adecuada de la actividad simpática y parasimpática</li> </ul>	La modulación inadecuada del sistema nervioso autónomo contribuye a las irregularidades cardiovasculares post-TCE	(Hilz et al., 2011)

Sujetos	Severidad del TCE	Tiempo de evaluación	Variables consideradas	Principales hallazgos	Conclusión	Referencia
20 pacientes con TCE y 20 personas sanas	Severo	En promedio 38 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>VFC mediante ECG, dos veces con separación de un mes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los cambios en la VFC se relacionaron más al tiempo de evaluación que con la severidad del trauma</li> </ul>	La actividad del sistema nervioso autónomo se recupera durante los primeros 3 meses post-TCE	(Keren et al., 2005)
333 pacientes en estado vegetativo (64% por TCE y 36% por otras causas)	Severo	77 ± 71 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>Incidencia, correlación con la etiología y relevancia de la disautonomía como predictor del pronóstico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La alteración autonómica ocurrió en el 26.1% de los pacientes con mayor incidencia en aquellos que sufrieron un TCE (39.1%)</li> </ul>	La desregulación autonómica influye en el pronóstico de los pacientes a	Dolce et al., 2008)
8 pacientes TCE con disautonomía 8 pacientes TCE sin disautonomía 16 pacientes control	Severo	81 ± 58 días post-TCE con un seguimiento a los 14 meses	<ul style="list-style-type: none"> <li>VFC por ECG y el pronóstico de la rehabilitación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los parámetros de la VFC fueron diferentes entre los subgrupos de TCE y cuando se compararon con el grupo control</li> <li>Los sujetos con alteraciones autonómicas mostraron alteraciones en la FC y el balance simpático/ parasimpático</li> </ul>	Las alteraciones autonómicas post-TCE se producen por la teoría de la “desconexión”	(Baguley et al., 2006)
16 pacientes con hiperactividad simpática paroxística y 71 pacientes sin dicha condición	Severo	64.8 ± 48 días posteriores a la admisión hospitalaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>Prevalencia, MRI, pronóstico y efecto en la recuperación neurológica de la hiperactividad simpática paroxística</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La hiperactividad simpática paroxística se presentó en el 18.4% de los pacientes</li> <li>Los pacientes con hiperactividad simpática paroxística mostraron lesiones más profundas, mayor tiempo de estancia en la UCI y peores pronósticos</li> </ul>	Se sugiere que la hiperactividad simpática paroxística se asocia con peores pronósticos en los pacientes y se asocia con una desconexión de mesencéfalo	(Lv et al., 2010)

Sujetos	Severidad del TCE	Tiempo de evaluación	Variables consideradas	Principales hallazgos	Conclusión	Referencia
7 pacientes con TBI y 7 controles	Severo	120 ± 134 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediciones de la VFC por ECG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 pacientes con TCE y solo 1 control presentaron alteraciones en el intervalo R-R</li> </ul>	Las anomalías en la VFC se presentan en el periodo agudo post-TCE	(King et al., 1997)
40 pacientes con TCE y 20 controles	Leve (20 pacientes) y moderado-severo (20 pacientes)	25.2 ± 20.5 (TCE leve) y 35.9 ± 27.7 meses (TCE moderado-severo)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediciones del intervalo R-R y la PAS en reposo y de pie</li> <li>• Determinación de la actividad simpática (frecuencias bajas) y parasimpática (frecuencias altas)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PAS y actividad simpática altas en reposo</li> <li>• Actividad parasimpática disminuida</li> <li>• Los efectos se observaron únicamente en los pacientes con TCE moderado-severo</li> </ul>	La disfunción autonómica es más pronunciada en el TCE moderado-severo y correlaciona con la severidad inicial del trauma	(Hilz et al., 2017)
25 pacientes con TCE y 29 controles	Leve	34 ± 29 meses post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Respiración, intervalo R-R y PAS en reposo y después de la maniobra de Valsalva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En reposo la modulación simpática y parasimpática fue menor en los pacientes con TCE</li> <li>• Después de la maniobra de Valsalva incrementó la activación parasimpática y disminuyó la simpática</li> </ul>	La desregulación autonómica es a nivel central con presencia de alteración en el reflejo barorreceptor antes un reto.	(Hilz et al., 2016)
51 pacientes con TCE y 30 controles	Moderado a severo	43.1 ± 33.4 meses post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediciones del intervalo R-R antes y durante estimulación de la presión ocular</li> <li>• Determinación de la actividad simpática (frecuencias bajas) y parasimpática (frecuencias altas)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En reposo fue menor la actividad simpática en los pacientes con TCE</li> <li>• Se incrementó la PAS en respuesta a la estimulación de la presión ocular en los pacientes con TCE</li> </ul>	<p>Durante la estimulación de la presión ocular no se activa la estimulación cardiovagal en los pacientes.</p> <p>El incremento en la PAS sugiere una disfunción autonómica a largo plazo</p>	(Wang et al., 2018)

Sujetos	Severidad del TCE	Tiempo de evaluación	Variables consideradas	Principales hallazgos	Conclusión	Referencia
85 veteranos con TCE y 485 controles	Leve	48 meses post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Escaneo del calcio de la arteria coronaria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El calcio de la arteria coronaria fue mayor en los pacientes con TCE</li> <li>• La tasa de mortalidad en los pacientes con TCE fue del 25% y de 10.5% en los controles</li> <li>• 72% de los pacientes con TCE desarrollaron hipertensión contra 57% en los controles</li> </ul>	El TCE se asocia con la severidad de la aterosclerosis coronaria e, indirectamente, predice la mortalidad	(Ahmadi et al., 2015)
16,211 pacientes con TCE y 32,422 controles	No se especifica	60 meses post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eventos adversos cardiovasculares y cerebrovasculares que incluyen insuficiencia cardiaca y arritmias, infarto isquémico y hemorrágico, y la muerte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los pacientes con TCE tienen 2.77 veces más riesgo de presentar eventos adversos cardiovasculares y cerebrovasculares: 1.72 de enfermedad cardiovascular, 2.10 de infarto isquémico, 6.02 de infarto hemorrágico y 3.13 de muerte</li> </ul>	El TCE induce efectos cardiovasculares a largo plazo	(Eric Nyam et al., 2019)

CFC, complejo de la frecuencia cardiaca; ECG, electrocardiograma; FC, frecuencia cardiaca; MRI, imagen por resonancia magnética; NO, óxido nítrico; PA, presión arterial; PAS, presión arterial sistólica; PAM, presión arterial media; SRB, sensibilidad del reflejo barorreceptor; TCE, traumatismo craneoencefálico; UCI, unidad de cuidados intensivos; VFC, variabilidad de la frecuencia cardiaca.

**Tabla 3. Estudios clínicos que demuestran las alteraciones cardiovasculares post-TCE.**

<b>Estudios preclínicos</b>						
<b>Modelo y especie</b>	<b>Severidad del TCE</b>	<b>Tiempo de evaluación</b>	<b>Variables y técnicas</b>	<b>Principales hallazgos</b>	<b>Conclusión</b>	<b>Referencia</b>
Modelo de percusión lateral por fluido en gatos	Leve, moderado y severo	10 s a 1 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niveles de adrenalina y noradrenalina por ensayo enzimático</li> <li>• Niveles de glucosa con un glucómetro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La adrenalina y la noradrenalina incrementan 500 y 300 veces con un pico máximo a 3.0 atm y 10 s post-TCE</li> <li>• Presencia de hipertensión y arritmias</li> </ul>	Descarga simpato-adrenal que correlaciona con la severidad del TCE	(Rosner et al., 1984)
Modelo de percusión lateral por fluido en ratas Wistar macho	Leve y moderado	10 y 30 min post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se evaluó el barorreflejo determinando la relación entre el intervalo R-R y la PAS usando el método modificado de fenilefrina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en la sensibilidad del reflejo barorreceptor sin cambios en la PAM en el TCE moderado pero no en el leve</li> </ul>	La sensibilidad del reflejo barorreceptor se modifica en el TCE moderado pero no en el leve	(McMahon et al., 2011)
Modelo de percusión lateral por fluido en ratas Wistar macho	Moderado	1, 2 y 4 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La PA y FC se midieron por canulación de la vena femoral</li> <li>• Los registros de la actividad del nervio esplácnico se realizaron con un electrodo bipolar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de la PA, FC y actividad del nervio esplácnico hasta 4 h post-TCE</li> <li>• El tratamiento con wogonina revirtió las alteraciones inducidas por el TCE</li> </ul>	La wogonina es un potencial tratamiento para las alteraciones cardiovasculares post-TCE	(Umemoto et al., 2019)

Modelo y especie	Severidad del TCE	Tiempo de evaluación	• Variables y técnicas	• Principales hallazgos	Conclusión	Referencia
Modelo de presión directa en el cráneo en ratas Sprague-Dawley macho	No se especifica	6 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La actividad del sistema nervioso simpático se midió con la expresión de las enzimas que sintetizan a las catecolaminas (TH y DβH) en la médula adrenal, así como la noradrenalina plasmática</li> <li>• Determinaciones de estrés oxidante (actividad de la NADPH) en el hipotálamo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La expresión de la TH y DβH, y los niveles de noradrenalina incrementaron en un 20, 25 y 23%, respectivamente</li> <li>• La actividad de la NADPH oxidasa incrementó en el hipotálamo</li> </ul>	La disfunción autonómica después del trauma puede estar mediada por el estrés oxidante en el hipotálamo	(Tümer et al., 2013)
Modelo y especie	Severidad del TCE	Tiempo de evaluación	Variables y técnicas	Principales hallazgos	Conclusión	Referencia
Modelo de lesión axonal difusa en ratas Sprague-Dawley macho	No se especifica	9, 24, 48 y 96 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mediciones de PAM y noradrenalina plasmática para evaluar la actividad simpática</li> <li>• Expresión de ROS, MDA y SOD para determinar el nivel de estrés oxidante en la RVLM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El TCE induce un incremento de la PAM y la noradrenalina, así como estrés oxidante en la RVLM.</li> </ul>	El estrés oxidante de la RVLM pudiera ser el mecanismo subyacente a la hiperactividad simpática post-TCE	(Chen et al., 2019)
Modelo de caída de peso	No se especifica	24 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expresión de bcl-2 por qRT-PCR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en la peroxidación de lípidos sin</li> </ul>	Existe estrés oxidante en el	(Emir et al., 2005)

| ANTECEDENTES

en ratas Wistar hembra			<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peroxidación de lípidos por el método de TBARS</li> </ul>	cambios en la expresión de bcl-2	corazón después de un TCE	
Modelo de caída de peso en ratas Wistar macho	Severo	24 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ECG, cTnI, IL-6, TNF-<math>\alpha</math> e IL-1<math>\beta</math> en tejido y suero</li> <li>• Histopatología del corazón y pulmones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No se encontraron diferencias funcionales, bioquímicas, inflamatorias o histopatológicas post-TCE</li> <li>• El dromotropismo en la aurícula era mayor en las ratas con TCE</li> </ul>	El TCE no induce cambios en el sistema cardiopulmonar	(Najafipour et al., 2014)
Modelo de percusión lateral por fluido en ratas Sprague-Dawley macho	Moderado	24 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se evaluó el tono miogénico de las arterias mesentéricas</li> <li>• Niveles de NO</li> <li>• La actividad de la arginasa</li> <li>• Especies reactivas de oxígeno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La relajación dependiente de endotelio disminuye después del TCE debido a una alteración en la producción de NO por incremento en la actividad de la arginasa</li> <li>• Existe estrés oxidante en el plasma y el endotelio después de la inducción del TCE</li> </ul>	El desacople de la eNOS dependiente de la arginasa-1 y el estrés oxidante inducen disfunción endotelial en arterias mesentéricas post-TCE	(Villalba et al., 2017)
<b>Modelo y especie</b>	<b>Severidad del TCE</b>	<b>Tiempo de evaluación</b>	<b>Variables y técnicas</b>	<b>Principales hallazgos</b>	<b>Conclusión</b>	<b>Referencia</b>
Modelo de percusión lateral por fluido en ratas Sprague-Dawley macho	Severo	24 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Miografía en arterias mesentéricas de resistencia</li> <li>• Niveles sanguíneos de PLA<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y metabolitos</li> <li>• Registros electrofisiológicos de las corrientes del Kir 2.1 sensibles a Ba<sup>2+</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El TCE induce una disminución de la relajación y de las corrientes Kir2.1 sensibles a Ba<sup>2+</sup>.</li> <li>• La señalización mediada por el metabolismo de lípidos se altera después del TCE</li> </ul>	La función del canal Kir2.1 se altera por incremento de la actividad de la PLA <sub>2</sub>	(Sackheim et al., 2021)

Modelo de percusión lateral por fluido en ratas Sprague-Dawley macho	No se especifica	48 h post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La PA se midió por canulación de la arteria caudal y el método pletoisométrico</li> <li>• La fracción de eyección del ventrículo izquierdo se midió por ECG-MRI</li> <li>• Especies reactivas de oxígeno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La PA y la contractilidad cardiaca aumentan después del TCE</li> <li>• Incremento de las especies reactivas de oxígeno en el tejido cardiaco</li> </ul>	La estimulación simpática podría estar mediada por las especies reactivas de oxígeno	(Larson et al., 2012)
CCI en ratón C57BL/6 silvestre y transgénico	Leve	1, 7 y 21 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Función vascular en aortas aisladas                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inmuno-fluorescencia y qRT-PCR para el canal TRPC6 en tejido de aortas</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El TCE induce una disfunción endotelial pronunciada y duradera que se pierde en el ratón KO y el antagonista para el TRPC6</li> <li>• La expresión del TRPC6 no cambia después del TCE</li> </ul>	La disfunción endotelial post-TCE pudiera estar mediada por la activación del TRPC6	(Chen et al., 2019)
<b>Modelo y especie</b>	<b>Severidad del TCE</b>	<b>Tiempo de evaluación</b>	<b>Variables y técnicas</b>	<b>Principales hallazgos</b>	<b>Conclusión</b>	<b>Referencia</b>
CCI en ratones C57BL/6	Moderado	3 y 30 días post-TCE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Función cardiaca con el ECG</li> <li>• Citometría de flujo e inmuno-fluorescencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hay disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y de acortamiento y apoptosis de los cardiomiocitos</li> </ul>	El TCE induce promueve la disfunción cardiaca infiltración de las células inmunes	(Zhao et al., 2019)

CCI, impacto cortical controlado; DβH, dopamina-β-hidroxilasa; FC, frecuencia cardiaca; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno; KO, knock out; NO, óxido nítrico; PA, presión arterial; PAS, presión arterial sistólica; PAM, presión arterial media; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A2; SRB, sensibilidad del reflejo barorreceptor; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; TCE, traumatismo craneoencefálico; TH, tirosina hidroxilasa.

---

---

## 2.2. Hipertensión y disfunción cardíaca post-TCE

En pacientes con TCE, la activación inmediata del sistema nervioso autónomo está asociado con un pronunciado incremento en el gasto cardíaco y la presión arterial media (PAM), y una disminución en la oxigenación de los tejidos (Fathizadeh et al., 2004). La disminución en la variabilidad de la frecuencia cardíaca está relacionada con la edad y predice el pronóstico de los pacientes con lesión cerebral, incluidos los que sufrieron un TCE (Biswas et al., 2000; Norris et al., 2006; Winchell & Hoyt, 1997).

Después de un TCE moderado a severo, los pacientes presentan un incremento significativo en la presión arterial sistólica (PAS) en reposo hasta los  $35.9 \pm 27.7$  meses comparados con pacientes de la misma edad pero  $25 \pm 20.5$  meses posteriores a un TCE leve o sin TCE (Hilz et al., 2017). Acorde con esto, en un estudio clínico retrospectivo a 10 años se reportó que el 20.1% de los pacientes con TCE moderado a severo desarrollan hipertensión, que representa la tercera comorbilidad más frecuente en pacientes con TCE solo por detrás del dolor de espalda (21.8%) y la depresión (20.1%). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en dicho estudio no se evaluaron relaciones de causalidad entre el TCE y las comorbilidades. Además, únicamente consideraron pacientes que sobrevivieron por lo menos 10 años después del TCE y no se incluyeron sujetos sin lesión (Hammond et al., 2019). Asimismo, en diversos modelos animales se demuestra una disminución de la presión arterial 1, 2 y 4 h post-TCE con un marcado incremento en esta variable a partir de las 9 h (Chen et al., 2019a). En este mismo sentido, los pacientes con TCE tuvieron 2.77 veces más riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares y cerebrovasculares adversos, incluyendo enfermedad cardiovascular (1.72 veces más riesgo), infarto isquémico (2.10 veces más riesgo) e infarto hemorrágico (6.02 veces más riesgo) (Eric Nyam et al., 2019).

La evidencia clínica, electrocardiográfica y bioquímica del daño miocárdico subsecuente al trauma sugiere que se debe a una oleada masiva de catecolaminas (Connor, 1969; Krishnamoorthy et al., 2017). En este sentido,

estudios patológicos muestran que la degeneración miofibrilar asociada al trauma es similar a los hallazgos histológicos que se observan en pacientes con feocromocitoma o en modelos animales experimentales de administración exógena de catecolaminas (Reichenbach & Benditt, 1970). Lo anterior sugiere que una concentración elevada de catecolaminas ejerce un efecto tóxico directo sobre el miocardio con un patrón de lesión distinto al patrón inflamatorio característico del infarto (Neil-Dwyer et al., 1978). Además, los niveles de creatina quinasa y de troponina están elevados frecuentemente en pacientes con TCE o cualquier otro tipo de trauma, aún en ausencia de daño mecánico en el pecho (Kaste et al., 1981; Maramattom et al., 2006; Martin et al., 2005). Los pacientes con trauma que desarrollan disfunción sistólica muestran un perfil hemodinámico caracterizado por una hipertensión y taquicardia tempranas, seguidas por una disminución de la presión arterial a lo largo del primer día post-TCE (Krishnamoorthy et al., 2017).

Aunado a los cambios autonómicos post-TCE, la evidencia pre-clínica muestra que las alteraciones cardiovasculares después del TCE pueden estar mediadas por el estrés oxidante (Chen et al., 2019; Emir et al., 2005; Larson et al., 2012; Tümer et al., 2013), desacople de la eNOS dependiente de la arginasa-1 (Villalba et al., 2017), activación inmune (Chen et al., 2019; Zhao et al., 2019), y disfunción del canal Kir2.1 endotelial (Sackheim et al., 2021), lo que sugiere que los cambios cardiovasculares post-TCE ocurren en respuesta a la disfunción autonómica, así como mecanismo que llevan a endotelio patía.

### **2.3. Efecto del H<sub>2</sub>S en el sistema nervioso autónomo a nivel central**

El H<sub>2</sub>S inicialmente se propuso como neuromodulador ya que incrementa la potenciación a largo plazo por interacción con los receptores NMDA (Abe & Kimura, 1996). Además, el H<sub>2</sub>S ejerce efectos neuroprotectores y regula procesos de aprendizaje y memoria, así como funciones cardiopulmonares (Kumar & Sandhir, 2018; Nagpure & Bian, 2015).

A la fecha, existe un debate creciente respecto a los efectos del H<sub>2</sub>S en la modulación de la función autonómica. Algunos autores sugieren que el H<sub>2</sub>S induce un efecto excitador en las estructuras centrales que regulan al sistema cardiovascular, lo que se traduciría en un incremento de la presión arterial y frecuencia cardíaca. En este sentido, se demostró que: (1) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), la sobreexpresión de la CBS en la RVLM conlleva a un incremento transitorio en la presión arterial, frecuencia cardíaca, así como un aumento los niveles de noradrenalina en la orina y respuestas vasopresoras probablemente mediadas por la vía del NO (Duan et al., 2015a); (2) potencia la respiración e inhibe la respuesta cardiovascular a la hipoxia, lo que sugiere que este gasotransmisor es responsable de la disfunción autonómica en las ratas SHR (Sabino et al., 2016); (3) la infusión intracerebroventricular de NaHS resulta en un incremento de la presión arterial media y la frecuencia cardíaca (Ufnal et al., 2008); (4) micro-inyecciones de GYY4137 en el PVN incrementan la actividad nerviosa del tono simpático renal, la frecuencia cardíaca y la presión arterial media en ratas con insuficiencia cardíaca crónica. Además, dichos efectos no dependen del H<sub>2</sub>S endógeno, ya que la inhibición de la CBS con hidroxilamina (HA) no modifica la actividad nerviosa del tono simpático renal, la frecuencia cardíaca o la presión arterial media (Gan et al., 2012).

Por otra parte, existen diversos estudios que demuestran que el H<sub>2</sub>S induce efectos inhibitorios sobre la actividad simpática que se presentan en los centros integradores a nivel del sistema nervioso central. En este contexto, la inhibición de la CBS con microinyecciones de hidroxilamina (HA) o ácido amino-oxiacético (AOOA) en la RVLM incrementa la actividad nerviosa del tono simpático renal, la frecuencia cardíaca y la presión arterial media, efectos que se bloquean con el pre-tratamiento con pinacidil (Duan et al., 2015b). Lo anterior sugiere que el H<sub>2</sub>S endógeno suprime la actividad del sistema nervioso simpático a través de la activación de los canales de potasio dependientes de ATP (K<sub>ATP</sub>). Acorde con esto, la administración bilateral de NaHS en la RVLM disminuye la actividad nerviosa del tono simpático renal, la

frecuencia cardíaca y la presión arterial de manera dosis-dependiente a través de los canales  $K_{ATP}$  y, en menor medida, la activación de la vía del NO (Guo et al., 2011). Además, en un modelo de hipertensión inducido por dieta rica en sal, el  $H_2S$  endógeno y exógeno disminuyen la actividad simpática al atenuar el estrés oxidante y las citocinas pro-inflamatorias dentro de la RVLM (Liang et al., 2017). La infusión de NaHS en el hipotálamo posterior reduce la presión arterial media y la frecuencia cardíaca en ratas en libre movimiento; mientras que, la inhibición de la CBS incrementa la presión arterial media por activación de los canales  $K_{ATP}$  (Dawe et al., 2008). Por último, el  $H_2S$  regula las respuestas cardiovasculares disminuyendo la activación de la NADPH oxidasa y, en consecuencia, la producción de especies reactivas de oxígeno en la RVLM (Yu et al., 2015).

Se debe de tener en cuenta la complejidad de las conexiones dentro del cerebro y que las diferencias en el efecto del  $H_2S$  en las estructuras que regulan el sistema cardiovascular pueden deberse a diferencias en las condiciones y aproximaciones experimentales. A pesar de los resultados contradictorios en el efecto de la administración central de  $H_2S$  sobre la función cardiovascular, parece claro que el  $H_2S$  está involucrado en la regulación de distintas funciones autonómicas. Al respecto, está demostrado que la aplicación del NaHS en neuronas del PVN y del NTS induce una pronunciada despolarización (Khademullah & Ferguson, 2013; Malik & Ferguson, 2016). De manera controversial, existe un reporte que indica que el  $H_2S$  no genera ningún efecto en la regulación del sistema cardiovascular cuando se aplica en la RVLM o en el PVN pero la principal razón para ese resultado pudiera ser las concentraciones tan bajas (0.2 a 2000 pmol) utilizadas en ese trabajo (Streeter et al., 2011).

En su conjunto, las evidencias anteriormente descritas sugieren que el  $H_2S$  ejerce efectos importantes en las estructuras centrales que regulan el sistema cardiovascular, tales como la RVLM o el PVN. Sin embargo, se requieren más estudios para esclarecer el debate actual en el área.

---

---

#### 2.4. Efecto del H<sub>2</sub>S en neuronas periféricas que regulan al sistema cardiovascular

Diversos estudios han demostrado que el H<sub>2</sub>S es capaz de regular la transmisión periférica, ya sea incrementándola o disminuyéndola, dependiendo del tipo neuronal. En este contexto, se demostró que la administración *in vitro* de GYY4137 promueve la liberación de neuropéptidos como el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP) de las neuronas sensoriales del cuello vesical de la vejiga y del uréter vesical de cerdos, respectivamente (Fernandes et al., 2013, 2014b). El efecto facilitador en las neuronas sensoriales podría estar mediado por la activación de los canales TRPV1 y TRPA1 (Fernandes et al., 2013, 2014b; Johnson et al., 2013). Por otra parte, la administración *in vitro* de donadores de H<sub>2</sub>S como el NaHS, GYY4137 o la L-Cis inhibe la liberación de [<sup>3</sup>H]noradrenalina inducida por estimulación eléctrica y disminuye los niveles endógenos de noradrenalina, adrenalina y dopamina en los cuerpos ciliares del iris y la uvea anterior de bovino (Kulkarni et al., 2009; Salvi et al., 2016). En este sentido, la infusión continua intravenosa de NaHS (310 y 560 µg/kg min), en ratas descerebradas y desmeduladas, disminuye el tono simpático vasopresor y cardioacelerador. Dicha disminución de la actividad simpática no involucra la interacción del H<sub>2</sub>S con los receptores α o β adrenérgicos (Centurión et al., 2016, 2018).

Acorde con lo anterior, la perfusión de NaHS en la arteria carótida de ratas anestesiadas disminuye la actividad de las neuronas simpáticas renales de manera dosis-dependientes; mientras que, la inhibición de la CSE con DL-propargilglicina ejerce el efecto opuesto (Guo et al., 2016). Contrario a lo anteriormente descrito, la inhibición de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S disminuye la transmisión ganglionar, lo que sugiere un efecto potenciador del H<sub>2</sub>S dentro del ganglio mesentérico superior del ratón (Sha et al., 2013). De manera interesante, Domínguez-Rodríguez y colaboradores (2017) reportaron un efecto dual del H<sub>2</sub>S en la transmisión simpática, ya que incrementa la liberación de [<sup>3</sup>H]noradrenalina en las terminaciones simpáticas

posganglionares pero hiperpolariza las neuronas del ganglio simpático. Por último, está reportado que el H<sub>2</sub>S regula la actividad del reflejo barorreceptor del seno carotídeo en ratas machos anestesiadas (Xiao et al., 2007).

En su conjunto, los estudios anteriormente descritos sugieren un papel clave del H<sub>2</sub>S en la modulación de la actividad sensorial y simpática. De ahí que, se sugiere que el H<sub>2</sub>S pudiera ser una molécula efectiva contra la disfunción autonómica observada en distintas patologías que cursan con dicha condición. De hecho, recientemente fue demostrado que la administración crónica de NaHS restaura las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica del tono simpático vasopresor en un modelo de obesidad por dieta rica en grasas (Gomez et al., 2019). Lo anterior sugiere que el H<sub>2</sub>S revierte la hiperactividad simpática inducida por la obesidad. Además, el H<sub>2</sub>S aumenta la sensibilidad del reflejo barorreceptor en ratas SHR; mientras que, la inhibición de la CBS con hidroxilamina ejerce el efecto opuesto, lo que sugiere un papel del H<sub>2</sub>S en la modulación del reflejo barorreceptor que se presenta con la persulfuración y consecuente activación del canal TRPV1 (Yu et al., 2017).

## **2.5. Efecto de los gasotransmisores en el TCE**

### **2.5.1. Sulfuro de hidrógeno**

El H<sub>2</sub>S está propuesto como un modulador del sistema nervioso autónomo (Centurión et al., 2016, 2018; Guo et al., 2016; Szabo, 2017; Yong et al., 2008). Además, este gasotransmisor está involucrado en distintas funciones fisiológicas incluyendo la vasodilatación (Mustafa et al., 2011), neurotransmisión (Abe & Kimura, 1996), angiogénesis (Papapetropoulos et al., 2009) e inflamación. En este sentido, el H<sub>2</sub>S desempeña un papel clave en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Vandini et al., 2019), la enfermedad de Parkinson (Sarukhani et al., 2018), la enfermedad de Huntington (Paul et al., 2014) y la lesión cerebral. Los efectos del H<sub>2</sub>S en las alteraciones neurológicas y sus efectos neuroprotectores asociados en diferentes tipos de lesión cerebral, incluido el TCE, se han

evaluado en estudios pre-clínicos (Che et al., 2018; Zhang et al., 2020). Los efectos de la modulación de la señalización del H<sub>2</sub>S en distintos tipos de lesión cerebral se presentan en la Tabla 4.

Particularmente, después del TCE existe una disminución de los niveles plasmáticos y corticales de H<sub>2</sub>S (Jiang et al., 2013; Zhang et al., 2013), cambios dinámicos en la corteza y el hipocampo de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S (Zhang et al., 2016; Zhang et al., 2013). Inicialmente, se reportó que la expresión de la proteína CBS disminuye 12 h post-TCE y se restablece al día 7 post-TCE en la corteza lesionada; mientras que, en el hipocampo la CBS disminuye a las 6 h post-TCE y se restaura parcialmente al día 7, sin cambios significativos en las estructuras contralaterales (Zhang et al., 2013). Por otro lado, los cambios en expresión de la enzima 3-MST son dinámicos a lo largo del tiempo post-TCE (Zhang et al., 2016). Lo anterior permite sugerir que los cambios en la biosíntesis de H<sub>2</sub>S son dinámicos, dependen de la estructura evaluada y pueden subyacer a las consecuencias a largo plazo del TCE.

Para el estudio de la implicación del H<sub>2</sub>S en el TCE se administraron donadores de H<sub>2</sub>S como pretratamiento o tratamiento agudo (Figura 10). Al respecto, se encontró que el pretratamiento con NaHS: (1) mitiga la muerte de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo y disminuye el volumen de la lesión en un modelo de TCE inducido por caída de peso (Zhang et al., 2013); (2) reduce el tamaño del edema y mejora la función motora y cognitiva por regulación de la apoptosis y autofagia en un modelo de TCE por caída de peso (Zhang et al., 2014); (3) restaura las alteraciones en la memoria observadas después del TCE en un modelo de impacto cortical controlado (CCI) (Karimi et al., 2017); (4) mantiene la integridad de la barrera y promueve la remielinización y la reparación axonal (Xu et al., 2018); (5) protege la función mitocondrial e inhibe la autofagia por activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR en un modelo de TCE inducido por CCI (Xu et al., 2018); e (6) inhibe el estrés oxidante mediado por glutamato a través de la vía de p53/GLS-2 en un modelo de TCE inducido por caída de peso (Sun et al., 2021).

Por otra parte, el tratamiento agudo con NaHS (5 minutos post-TCE inducido por CCI) disminuye los cambios en la permeabilidad de la BHE, el tamaño del edema y el volumen de la lesión. Dichos efectos dependen de la activación del  $K_{ATP}$  mitocondrial, ya que la inhibición de dicho canal con 5-hidroxidecanoato abole los efectos inducidos por NaHS (Jiang et al., 2013). Además, el tratamiento subcrónico (14 días) con ATB-346, un inhibidor de la ciclooxigenasa que libera  $H_2S$ , reduce el tamaño del edema y la muerte neuronal, mejora la función neurológica y disminuye la respuesta inflamatoria observada post-TCE inducido por CCI (Campolo et al., 2014). En conjunto, estas evidencias sugieren que el  $H_2S$  está implicado en la fisiopatología de las alteraciones neurológicas inducidas por el TCE.

Tabla 4. Efecto de la modulación de los niveles de H<sub>2</sub>S en distintos modelos de lesión cerebral

Fármaco	Mecanismo de acción	Tipo de lesión cerebral	Especie	Dosis y tiempo de administración	Conclusión	Referencias
Ácido amino-oxiacético	Inhibidor de la CBS	Lesión cerebral isquémica	Ratas Wistar macho	2.7-54 mg/kg; i.p. Al inicio de la MCAO	A dosis bajas induce efectos protectores pero a dosis altas empeora la lesión isquémica	(Hadadha et al., 2015)
L-cisteína	Sustrato de las enzimas	Hemorragia subaracnoidea	Ratas Wistar macho	244.9 mg; i.c.v. 30 min después de la SAH	Inhibe la apoptosis a través de la vía de CBS/H <sub>2</sub> S	(Li et al., 2017b)
H <sub>2</sub> S inhalado	H <sub>2</sub> S exógeno	Lesión cerebral isquémica	Ratas Sprague-Dawley macho	40 y 80 ppm; Al inicio de la reperusión	Mejora la función neurológica por regulación a la baja de la AQP4 por activación de la PKC	(Wei et al., 2015)
NaHS	Donador inorgánico de H <sub>2</sub> S	Traumatismo craneoencefálico	Ratones CD1 macho	0.56-10 mg/kg; i.p. 30 min antes de la inducción del TCE	Protege contra el daño inducido por el TCE	(Zhang et al., 2013)
			Ratas Sprague-Dawley macho	3 mg/kg; i.p. 5 min post-TCE	Mejora el pronóstico al activar los canales K <sub>ATP</sub> mitocondriales y disminuyendo el estrés oxidante	(Jiang et al., 2013)
			Ratones CD1 macho	5.6 µg/kg- 2.5 mg/kg; i.p. 30 min antes de la inducción del TCE	Induce neuroprotección por regulación de las vías de apoptosis y autofagia	(Zhang et al., 2014)
			Ratas Wistar macho	3 y 5 mg/kg; i.p. 5 min antes de la inducción del TCE	Previene los déficits en la memoria observados después del TCE	(Karimi et al., 2017)
			Ratones C57BL6 macho	56 µg/kg; i.p. 30 min antes de la inducción del TCE	Induce neuroprotección mediada por la reparación axonal y la inhibición de la autofagia	(Xu et al., 2018)

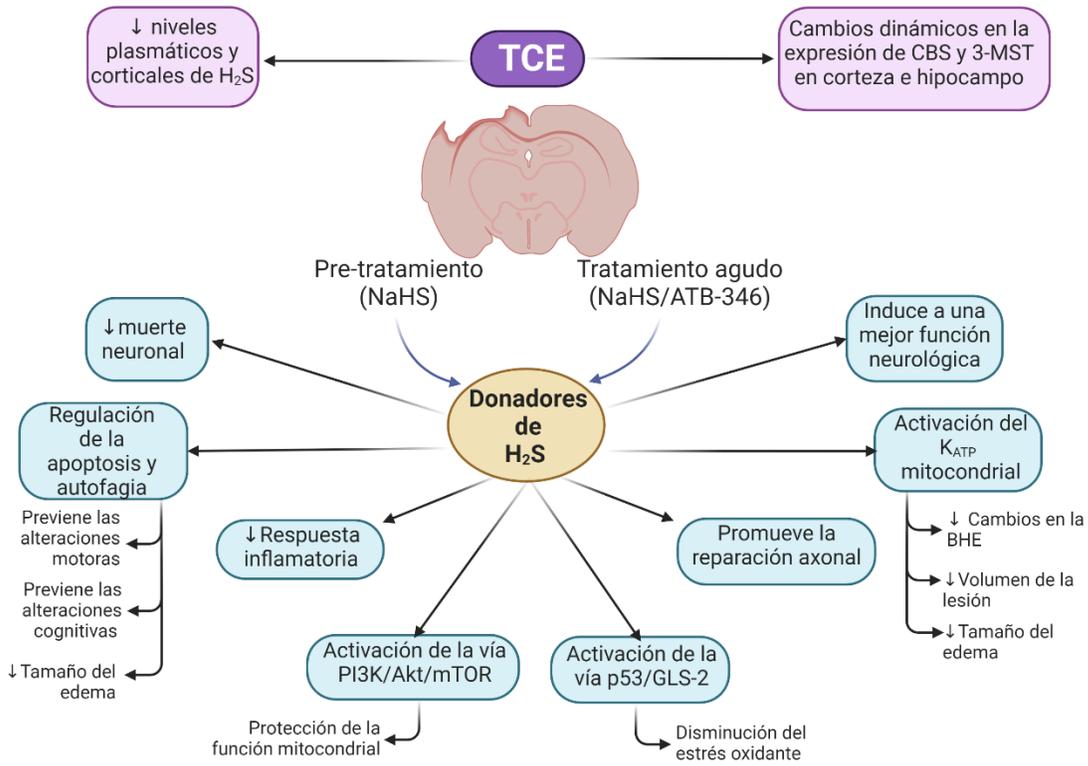
| ANTECEDENTES

	Ratas Sprague-Dawley macho	56 mg/kg; i.p. 30 min post-TCE	Disminuye el estrés oxidante por glutamato y restaura la función motora y la memoria espacial	(Sun et al., 2021)
Lesión cerebral isquémica	Ratas Wistar macho	1 y 5 mg/kg; i.p. Al inicio de la isquemia	Reduce el edema cerebral por inhibición de la apoptosis	(Gheibi et al., 2014)
	Ratones KM macho	1, 2, 4, 8, y 16 mg/kg; i.p. Al inicio de la isquemia	Promueve neuroprotección por regulación a la baja de la autofagia	(Shui et al., 2016)
	Ratas Sprague-Dawley macho	5.6 mg/kg	Atenúa la lesión cerebral por supresión de la autofagia	(Jiang et al., 2017)
	Ratas Sprague-Dawley macho	560 µg/kg; i.v. Después de la isquemia	Induce efectos protectores por restablecimiento de la contracción y relajación dependientes de endotelio en los vasos cerebrales	(Wen et al., 2018)
Hemorragia subaracnoidea	Ratas Sprague-Dawley macho	0-8 y 5.6 mg/kg; i.p. 1 h después de la SAH	Inhibe la apoptosis neuronal por disminución de la actividad de la MST1	(Shi et al., 2017)
	Ratas Sprague-Dawley macho	5.6 mg/kg; i.p. Diferentes tiempos después de la SAH	Reduce las alteraciones cognitivas por disminución de la neuroinflamación a través de las vías de TLR4/NF-κB y Akt/ERK	(Duan et al., 2020; Li et al., 2017a)
	Ratas Sprague-Dawley macho	785.4 µg/kg; i.p. 1 semana antes de la SAH	Induce neuroprotección por modulación de los canales de Ca <sup>2+</sup> tipo L	(Duan et al., 2021)
Resucitación de shock hemorrágico	Ratas Wistar macho	0.2 mg/kg; i.v. 10 min antes del tiempo de retransfusión	Mejora la hemodinámica en la fase de resucitación temprana después del shock hemorrágico	(Ganster et al., 2010)

**| ANTECEDENTES**

ATB-346	Donador de H <sub>2</sub> S derivado del naproxeno	Traumatismo craneoencefálico	Ratones CD1 macho	11 mg/kg; p.o. 1 y 6 h post-TCE	Promueve la recuperación funcional al disminuir la respuesta inflamatoria post-TCE	(Campolo et al., 2014)
ADT	Donador de H <sub>2</sub> S de liberación lenta	Lesión cerebral isquémica	Ratones CD1 macho	5 mg/kg; i.p. 3 h después de la reperusión	Promueve los efectos antiinflamatorios mediados por la microglía	(Zhang et al., 2017)
GY-4137	Donador de H <sub>2</sub> S de liberación lenta	Lesión cerebral isquémica	Ratas Sprague-Dawley macho	4.6 mg; i.c.v. Justo antes de la reperusión	Mejora la función neurológica y reduce el área del infarto al inhibir la apoptosis	(Han et al., 2020)
AP39	Donador de H <sub>2</sub> S de liberación lenta que llega a la mitocondria	Lesión cerebral isquémica	Ratas Sprague-Dawley macho	36 µg/kg; i.v. Diario por 7 días	Induce tolerancia cerebral a la isquemia incrementando las vías de BDNF-TrkB y NGF-TrkA, y reduciendo la vía de proNGF-p75NTR-sortilina	(Pomierny et al., 2021)

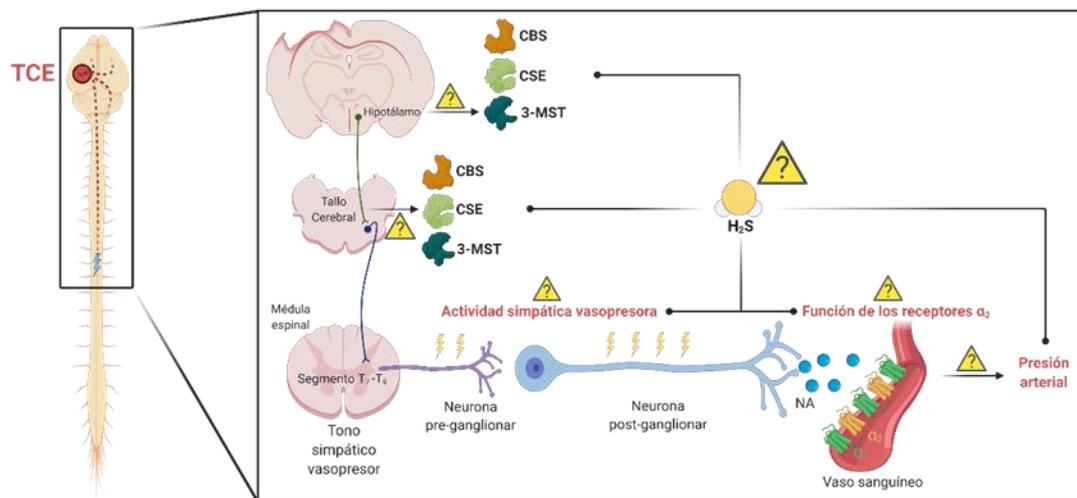
AQP4, acuaporina-4; BDNF, factor neurotrófico derivado del cerebro; CBS, cistationina-B-sintasa; MCAO, oclusión de la arteria cerebral media; MST1, proteína estimuladora de macrófagos; NaHS, sulfhidrato de sodio; NGF, factor de crecimiento neuronal; PKC, proteína quinasa C.



**Figura 10. Efectos del H<sub>2</sub>S en las alteraciones neurológicas post-TCE.** Después de un TCE existe una disminución de los niveles plasmáticos y corticales que se acompaña con una regulación a la baja de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en la corteza y el hipocampo. El pretratamiento, así como el tratamiento agudo, induce un efecto benéfico en las alteraciones neurológicas observadas después de un TCE a través de distintos mecanismos. Figura creada con Biorender.com

### 3. JUSTIFICACIÓN

El TCE induce disfunción autonómica que conlleva a alteraciones cardiovasculares. Además, el H<sub>2</sub>S ha mostrado tener efectos cardio- y neuroprotectores. Dentro de estos efectos, está reportado que el H<sub>2</sub>S es capaz de modular la expresión génica, inhibir el tono simpático y producir respuestas hipotensoras. Sin embargo, se desconoce el efecto del H<sub>2</sub>S sobre las alteraciones hemodinámicas y simpáticas subsecuentes al TCE severo. Dado los efectos del H<sub>2</sub>S, es posible que la administración subcrónica de H<sub>2</sub>S revierta las alteraciones hemodinámicas inducidas por el TCE severo a través de la disminución de la hiperactividad simpática y restauración de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S (Figura 11).



**Figura 11. Justificación.** Posibles alteraciones autonómicas, hemodinámicas y de expresión proteica de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el hipotálamo y el tallo cerebral. Se desconoce el efecto que tiene el H<sub>2</sub>S sobre las alteraciones en la actividad simpática, presión arterial y la expresión de las enzimas que lo sintetizan. Figura creada con Biorender.com

#### **4. HIPÓTESIS**

El tratamiento subcrónico con NaHS, un donador de H<sub>2</sub>S, revertirá las alteraciones hemodinámicas inducidas por el TCE severo por inhibición del tono simpático vasopresor y restauración de la expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el hipotálamo y el tallo cerebral.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto subcrónico con NaHS, un donador de H<sub>2</sub>S, en las alteraciones hemodinámicas, simpáticas y de la expresión proteica de las enzimas que sintetizan el H<sub>2</sub>S en el hipotálamo y el tallo cerebral inducidas por el TCE severo en ratas Wistar.

### 5.2. Objetivos particulares

En animales con TCE severo, evaluar el efecto del tratamiento subcrónico con NaHS en:

- 5.2.1. Los cambios de la expresión proteica de las enzimas CBS, 3-MST y CSE en el tallo cerebral e hipotálamo por medio de la técnica de Western blot.
- 5.2.2. Los cambios en la frecuencia cardiaca, presión arterial y función sensoriomotora por el método pletismográfico.
- 5.2.3. La actividad del sistema nervioso simpático vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Animales

En el desarrollo de este proyecto se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un rango de peso inicial de 230-280 g. Los animales fueron otorgados y mantenidos por el bioterio de la Sede Sur del Cinvestav y alojados en jaulas de plástico en un cuarto con temperatura y humedad controlada ( $22 \pm 1$  °C, 50% HR) con periodos de luz-oscuridad 12/12 h con alimento y agua *ad libitum*. Los procedimientos en el presente proyecto de investigación 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.

### 6.2. Grupos experimentales

#### 6.2.1. Objetivo 1

Los experimentos de este objetivo se diseñaron para determinar las alteraciones en la expresión proteica de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S después de un TCE severo, así como el efecto del tratamiento subcrónico con NaHS (por 7 días) en dichos cambios. Para tal propósito, se utilizaron los siguientes grupos experimentales (Figura 12A):

- 6.2.1.1.** Grupo TCE+ PBS (n = 20). Los animales utilizados en este grupo se sometieron a un TCE severo. A los animales se les realizó la prueba de *neuroscore* un día antes y dos días después de la inducción del TCE para confirmar el pronóstico de un TCE severo, de acuerdo a lo previamente reportado (Santiago-Castañeda et al., 2020; Segovia-Oropeza et al., 2020). Veinticuatro horas después del trauma, los animales se administraron de manera i.p. diaria durante 7 días de solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS; 1 ml/kg; vehículo del

NaHS). Los animales se anestesiaron con isoflurano (3%) y se sacrificaron por decapitación para la recolección del hipotálamo y el tallo cerebral. Ambos tejidos se recolectaron al día 1, 2, 3, 7 y 28 post-TCE (n = 4, cada día). El tejido obtenido se almacenó a -70 °C hasta su posterior procesamiento. Se utilizó la técnica de Western blot para determinar el curso temporal de los cambios en la expresión proteica (Figura 12B).

**6.2.1.2.** Grupo TCE + NaHS (n = 8). Las ratas se sometieron al procedimiento anteriormente mencionado para el grupo TCE + PBS, excepto que los animales del presente grupo recibieron una administración i.p. diaria durante 7 días de NaHS (3.1 mg/kg) en lugar del PBS. El tejido se recolectó de acuerdo con lo descrito para el grupo TCE + PBS, con la diferencia que para este grupo el tejido se recolectó al día 7 y 28 post-TCE (n = 4, cada uno).

**6.2.1.3.** Grupo *Sham* (n = 4). Los animales se manipularon como el grupo TCE + PBS, excepto que las ratas del presente grupo no recibieron el TCE y el tejido se recolectó únicamente al día 2 post-TCE.

## **6.2.2. Objetivo 2**

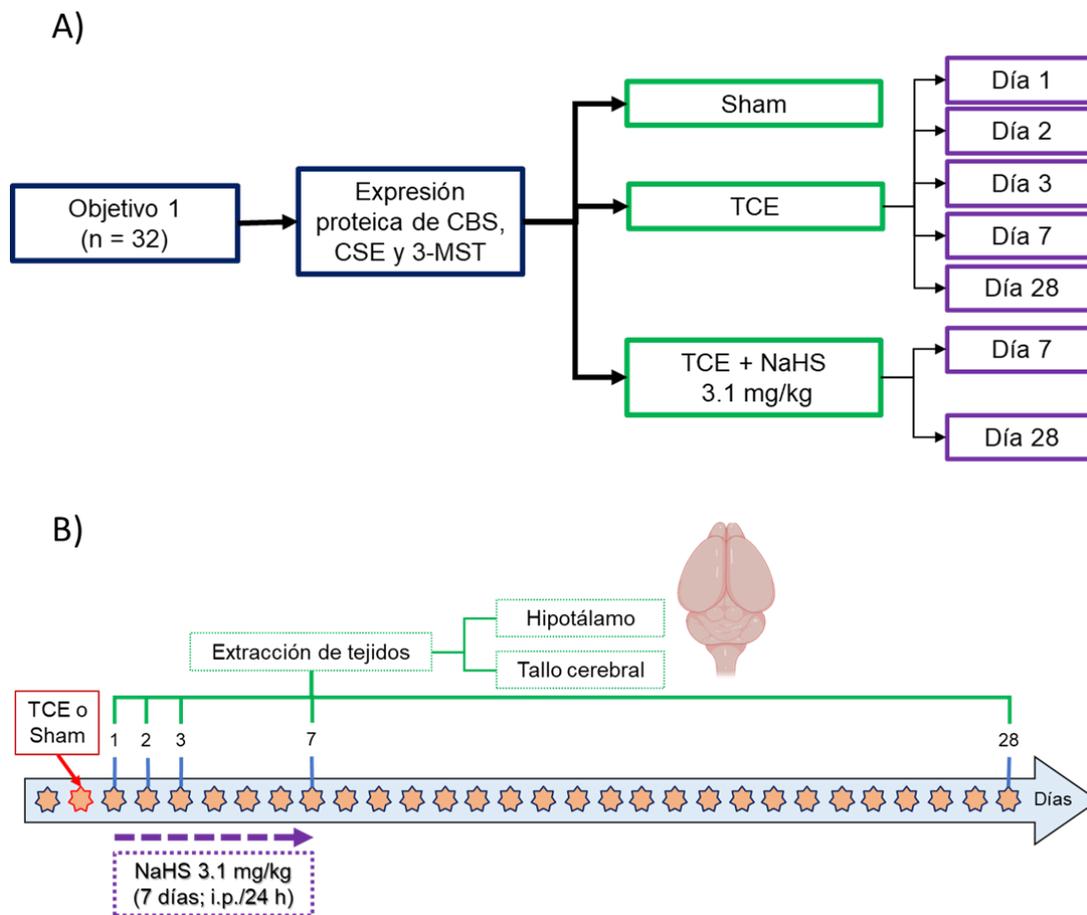
Los experimentos del presente objetivo se diseñaron para determinar el efecto del tratamiento subcrónico con NaHS (por 7 días) para prevenir el desarrollo de alteraciones sensoriomotoras y hemodinámicas observadas después de un TCE severo. Para tal propósito, se contaron con los siguientes grupos experimentales (Figura 13A):

**6.2.2.1.** Grupo TCE+ PBS (n = 7). Las ratas se sometieron a un TCE severo. Veinticuatro horas después de la inducción del trauma. Los animales se trataron con una administración i.p. diaria durante 7 días de PBS (1 ml/kg; vehículo del NaHS). Las variables hemodinámicas (frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, y presión arterial media)

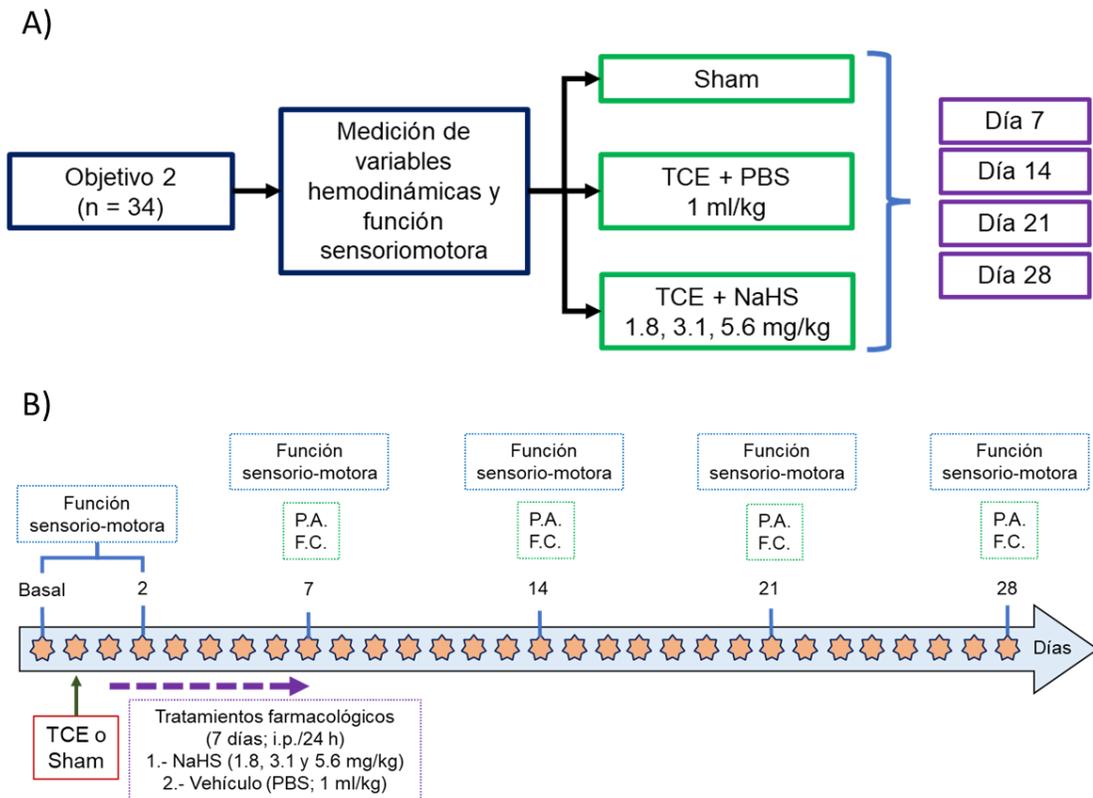
fueron determinadas semanalmente (día 7, 14, 21 y 28 post-TCE). La función sensoriomotora se determinó un día antes y 2, 7, 14, 21 y 28 días después de la inducción del TCE (Figura 13B).

**6.2.2.2.** Grupo TCE + NaHS (n = 21). Los animales se sometieron al mismo procedimiento que el grupo TCE + PBS, excepto que recibieron dosis crecientes de NaHS (1.8, 3.1 y 5.6 mg/kg) en lugar del PBS (n = 7, cada uno).

**6.2.2.3.** Grupo *Sham* (n = 6). Los animales fueron manipulados como el grupo TCE + PBS, excepto que las ratas del presente grupo no recibieron el trauma.



**Figura 12. Diseño experimental y curso temporal de los experimentos realizados para el objetivo 1.** 3-MST, 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa; CBS, cistationina- $\beta$ -sintetasa; CSE, cistationina- $\gamma$ -liasa; i.p., intraperitoneal; TCE, traumatismo craneoencefálico.



**Figura 13. Diseño experimental y curso temporal de los experimentos realizados para el objetivo 2.** FC, frecuencia cardiaca; PA, presión arterial; PBS, solución amortiguadora de fosfato; TCE, traumatismo craneoencefálico.

### 6.2.3. Objetivo 3

Los experimentos del presente objetivo se diseñaron para determinar el efecto del tratamiento subcrónico con NaHS (por 7 días) para prevenir el desarrollo de las alteraciones en la actividad del sistema nervioso simpático vasopresor observadas después de un TCE severo. Para tal propósito se contó con los siguientes grupos experimentales (Figura 14A):

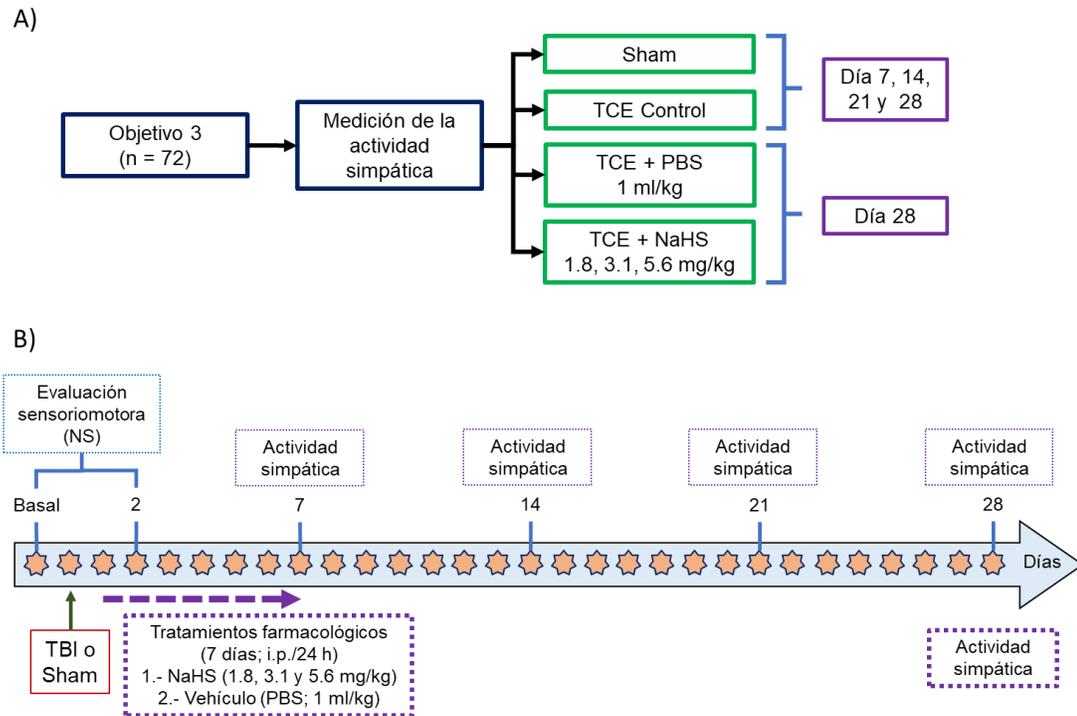
- 6.2.3.1. Grupo TCE (n = 24).** Los animales se sometieron a un TCE severo, y posteriormente se utilizaron para valorar la progresión *in situ* de las alteraciones simpáticas. Con el fin de realizar dichas determinaciones, las ratas se subdividieron en 4 grupos para evaluar los cambios de la actividad simpática vasopresora al día

7, 14, 21 y 28 post-TCE (n = 6, cada grupo) (Figura 14B). Los animales empleados para las determinaciones al día 28 fueron los mismos que los empleados para el objetivo 2.

**6.2.3.2.** Grupo TCE + PBS (n = 6). Para las determinaciones de la actividad simpática, los animales del grupo TCE + PBS del objetivo 2 se descerebraron y desmedularon al día 28, después de las evaluaciones de presión arterial y función sensoriomotora.

**6.2.3.3.** Grupo TCE + NaHS (n = 18). Para este grupo, los animales del grupo TCE + NaHS del objetivo 2 fueron descerebrados y desmedulados al día 28, después de las evaluaciones de presión arterial y función sensoriomotora. Los animales recibieron NaHS a las dosis de 1.8, 3.1 y 5.6 mg/kg.

**6.2.3.4.** Grupo *Sham* (n = 24). Los animales se manipularon como el grupo TCE, excepto que las ratas del presente grupo no recibieron el trauma. Las ratas se subdividieron en 4 grupos para evaluar los cambios de la actividad simpática vasopresora al día 7, 14, 21 y 28 post-TCE (n = 6, cada grupo).

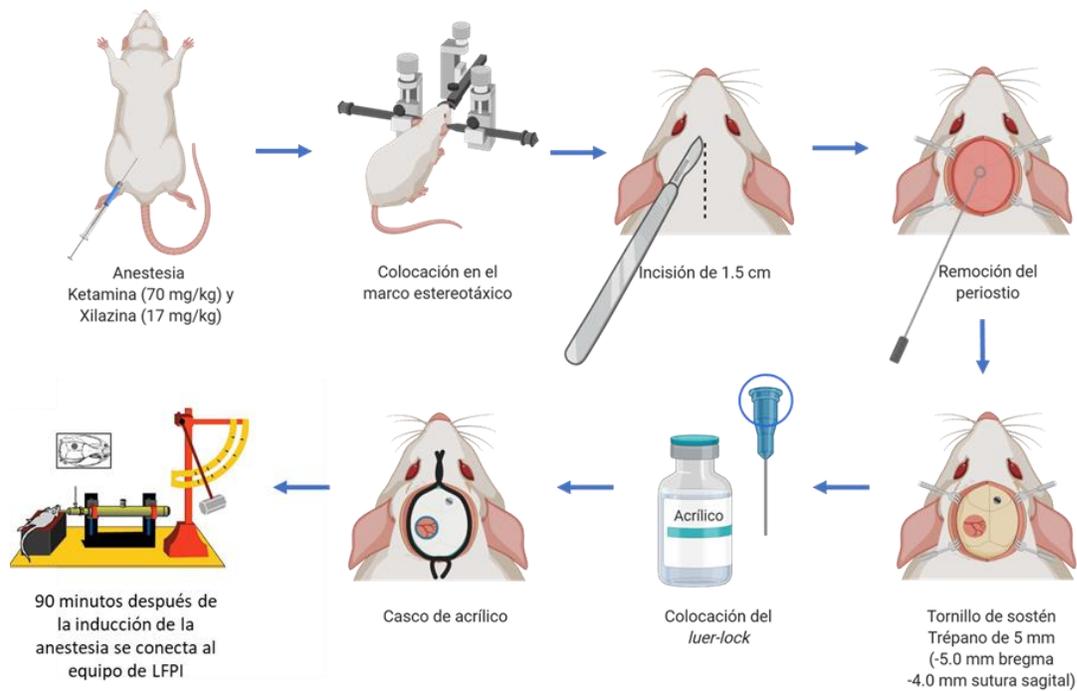


**Figura 14. Diseño experimental y curso temporal de los experimentos realizados para el objetivo 3.** NS, *neuroscore*; PBS, solución amortiguadora de fosfato; TCE, traumatismo craneoencefálico.

### 6.3. Modelo de percusión lateral por fluido

Los animales se anestesiaron con ketamina (70 mg/kg; i.p.) y xilacina (17 mg/kg; i.m.). Una vez que los animales se encontraban anestesiados fueron montados en el marco estereotáxico. Posteriormente, se realizó una incisión sagital de 1.5 cm en la línea media entre las orejas extendiéndose desde la nariz hacia el cuello. El periostio que recubre el cráneo se removió con ayuda de un hisopo de algodón. Se realizó un trépano de 5 mm de diámetro en la parte lateral izquierda a 4.0 mm de la sutura sagital y 5 mm de bregma comprobando que la duramadre estuviera intacta. El “*luer lock*” se fijó al diámetro del trépano con pegamento para tejido (VetBond). La correcta colocación del “*luer lock*” se comprobó llenando el “*luer lock*” con solución salina y verificando la ausencia de fugas. Se colocó un tornillo de acero inoxidable en la parte lateral anterior a bregma con la finalidad de dar soporte temporal al casco de acrílico dental. Después de 90 minutos de la

administración de la anestesia, los animales se conectaron al equipo de percusión lateral por fluido (modelo FP302) que consiste en un cilindro de Plexiglás que contiene solución salina estéril. (McIntosh et al., 1989). En uno de los extremos del cilindro se encuentra un transductor de señal que mide la intensidad del golpe y permite conectar el “luer lock”. La lesión se produjo por medio de un péndulo que golpea el pistón del cilindro y genera un pulso de presión que viaja a través del transductor hasta el cráneo del animal (Ma et al., 2019) (Figura 15).



**Figura 15. Protocolo experimental para la inducción del TCE severo mediante el modelo de percusión lateral por fluidos.** Los animales son anestesiados y posteriormente se les realiza una cirugía estereotáxica para generar una craneotomía a -5.0 mm de bregma y -4.0 mm de la sutura sagital. En la craneotomía se coloca un “luer lock” que permite conectar a los animales al equipo de LFPI. LFPI, lesión por percusión lateral por fluidos. Figura creada con Biorender.com

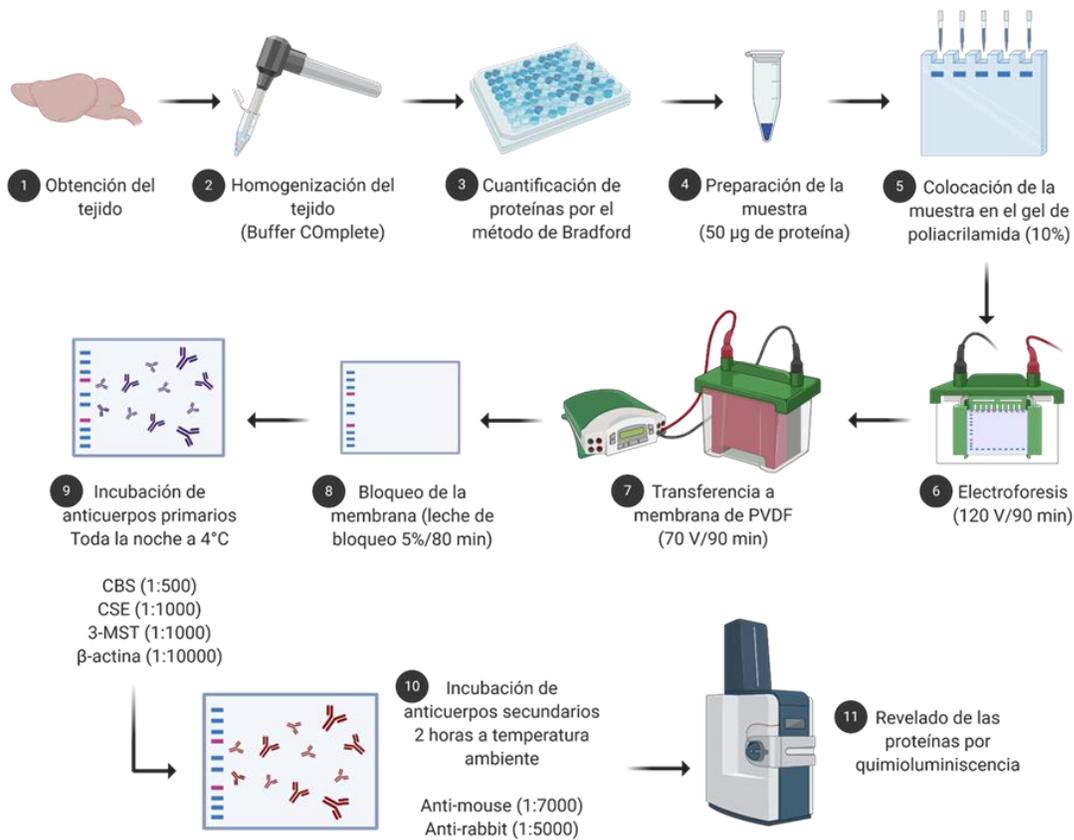
---

---

#### 6.4. Detección de las enzimas CBS, CSE y 3-MST en el tallo y el hipotálamo

Los animales fueron sacrificados por decapitación para la obtención del tejido cerebral. Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos de polipropileno de 1.6 ml para ser almacenadas a -70 °C hasta su posterior análisis. Las muestras se homogeneizaron (Glas-Col, Modelo 099C K54, IN) en 300 µl de solución amortiguadora cOmplete (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 100-x 1%, deoxicolato de sodio 5% y SDS 0.1%) que contenía inhibidores de proteasas (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich; Cat. No. 4693159001). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recolectó y almacenó a -70 °C hasta la cuantificación de las proteínas totales. La cuantificación se realizó mediante el método de Bradford de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 1; Bio-Rad; Cat. No. 5000201). Se tomaron 50 µg de proteína total que fueron separados en un gel SDS-PAGE al 10% durante 90 minutos a 120 V; y subsecuentemente transferidas a una membrana de PVDF durante 90 a 70 V. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en PBS-Tween20 al 0.1%. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-CBS (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-133154), anti-CSE (dilución 1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-365381) y anti-3-MST (dilución 1:1000; Sigma-Aldrich; Cat. No. HPA001240). Se utilizó la expresión de  $\beta$ -actina (anti- $\beta$  actina dilución 1:10000; GeneTex; Cat. No. GTX5512) para normalizar los niveles de expresión de las proteínas. La detección del anticuerpo primario se realizó utilizando un anticuerpo secundario anti-mouse (dilución 1:7000; GeneTex; Cat. No. GTX21311-01) para la  $\beta$ -actina y las enzimas CBS y CSE; y anti-rabbit para la enzima 3-MST (dilución 1:5000; GeneTex; Cat. No. GTX213110-01). La señal de los inmunoblots se detectó mediante quimioluminiscencia (ChemiDoc™ XRS+ *ImagingSystem*, Bio-Rad,

CA). El análisis de las bandas se realizó por densitometría (ImageLab™, Bio-Rad, CA, EUA) (Figura 16).



**Figura 16. Procedimiento experimental para la realización de la técnica de Western Blot.**

Se obtuvo el tejido cerebral y fue disecado en las estructuras de interés para ser homogeneizado. Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida para posteriormente ser sometidas a un campo eléctrico y separar las proteínas de acuerdo con su peso molecular. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF, misma que después fue bloqueada con leche al 5%. La membrana se incubó con anticuerpos específicos dirigidos para las proteínas de interés utilizando a la β-actina como control de carga. Tras la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, las proteínas fueron reveladas por quimioluminiscencia para su posterior análisis densitométrico. Figura creada con Biorender.com

## 6.5. Evaluación de la función sensoriomotora y la coordinación motora

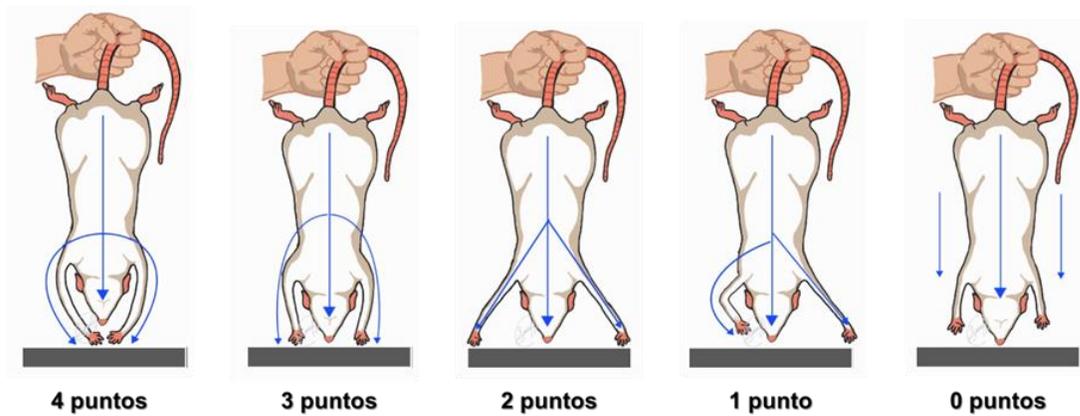
### 6.5.1. Neuroscore

La prueba de *neuroscore* consiste en una batería de ensayos conductuales que permite evaluar la función sensoriomotora y que incluye: (a) prueba de

extensión de extremidades anteriores, (b) prueba de extensión de extremidades posteriores, (c) pulsión lateral, y (d) plano inclinado (Hausser et al., 2018; McIntosh et al., 1989). Para cada prueba, los animales reciben una puntuación que va de 0 a 4, donde el 4 representa una función sensoriomotora normal y el 0 representa la pérdida total de la función (Pierce et al., 1998). Una puntuación final de 26 a 28 puntos es sinónimo de una función normal, de 20 a 25 puntos sugieren un TCE leve, de 16 a 20 puntos son indicativo de un TCE moderado; mientras que, 15 puntos o menos corresponden a un TCE severo (McIntosh et al., 1989).

#### **6.5.1.1. Extensión de extremidades anteriores**

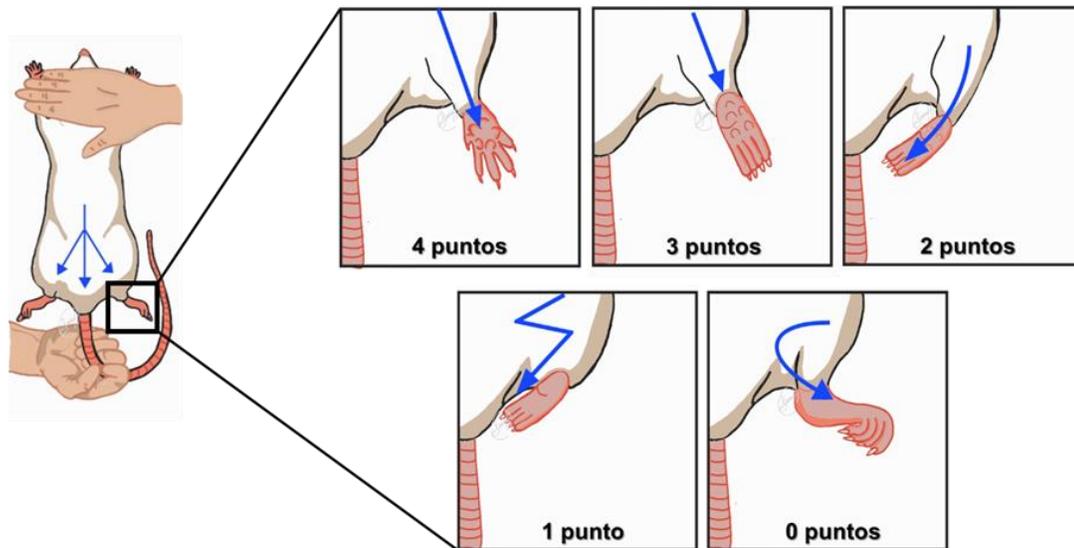
La prueba de extensión de extremidades anteriores consiste en sujetar al animal de la parte media de la cola y elevarlo a aproximadamente 10 cm del tapete. Posteriormente, el animal se acerca hacia el tapete y se evalúa el reflejo de paracaídas (extensión rápida de las extremidades anteriores) en ambas extremidades. En esta prueba, se otorgan 4 puntos cuando se observa un espacio entre las extremidades anteriores y se obtiene una respuesta instantánea caracterizada por la extremidad extendida hacia el tapete en un movimiento fluido y suave. Se califica con 3 puntos a los animales que son capaces de extender la extremidad hacia el frente pero la respuesta no es instantánea (tarda más de 5 segundos) y carece de fuerza y fluidez. La extremidad recibe 2 puntos cuando se presentan espasmos y queda extendida a 45° respecto al plano corporal del animal. Los animales reciben 1 punto cuando existe respuesta pero la extremidad se encuentra extendida y perpendicular al plano del cuerpo del animal o presenta espasticidad en flexión o extensión. Se otorgan 0 puntos cuando no existe respuesta alguna, la nariz del animal toca el tapete de evaluación y se observa pérdida del tono muscular (Figura 17). Ambas extremidades se califican de manera independiente, por lo que el puntaje máximo posible es de 8 puntos por cada animal en esta prueba.



**Figura 17. Prueba de extensión de extremidades posteriores del *neuroscore*.** Los animales son sostenidos de la parte media de la cola para elevarlo a 10 cm del tapete de evaluación. Los animales se acercan hacia el tapete y se evalúa la extensión rápida de las extremidades anteriores de ambas extremidades. La puntuación otorgada va desde 4 hasta 0, dónde 4 representa una función normal y 0 una pérdida total de la función. Figura creada por Silvia Huerta en el programa Samsung Notes.

#### 6.5.1.2. Extensión de extremidades posteriores

Para la prueba de extensión de extremidades posteriores, los ojos de los animales son cubiertos con una mano y se observan ambas extremidades posteriores mientras se jala al animal por la cola hacia atrás de manera gentil y rápida. Se observa la extensión cuando se levanta al animal para iniciar el movimiento. En esta prueba, los animales reciben 4 puntos si la extensión hacia atrás fue completa, instantánea y la palma de la extremidad se mueve hacia arriba y los dedos se separan por completo. Se otorgan 3 puntos cuando la extensión es completa pero el movimiento no es instantáneo y los dedos no se separan. La extremidad recibe 2 puntos cuando no se extiende por completo, se forma una curva hacia la cola del animal y el movimiento carece de fuerza. Los animales reciben una puntuación de 1 si la extremidad se volteada hacia atrás con la palma hacia arriba pero no se observa la extensión. Se calificó con 0 puntos cuando no hubo respuesta y la extremidad posterior presenta espasticidad en flexión (Figura 18). Ambas extremidades se califican de manera independiente, por lo que el puntaje máximo posible es de 8 puntos por cada animal en esta prueba.

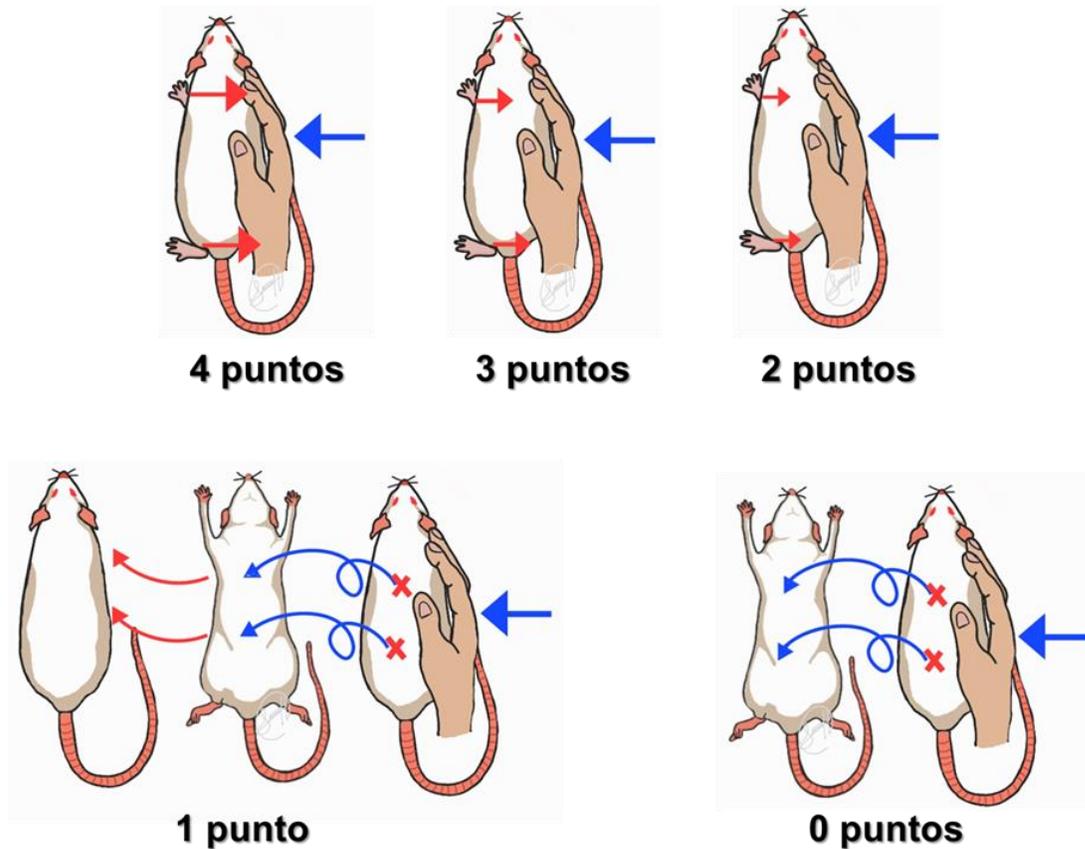


**Figura 18. Prueba de extensión de extremidades posteriores del *neuroscore*.** Los animales se jalan de la cola hacia atrás de manera gentil y rápida. Se observa la extensión cuando se levanta al animal para iniciar el movimiento. La puntuación otorgada va desde 4 hasta 0, dónde 4 representa una extensión normal y 0, una pérdida total de la función. Figura creada por Silvia Huerta en el programa Samsung Notes.

### 6.5.1.3. Pulsión lateral

Para la realización de esta prueba, el animal es empujado de su parte lateral a lo largo del tapete de evaluación para probar su fuerza y resistencia al movimiento. Para tal fin, el animal es colocado longitudinalmente y es empujado hacia ambas direcciones (izquierda y derecha). El animal obtiene 4 puntos por lado si ofrece resistencia, se sostiene fuertemente del tapete y mueve coordinadamente sus extremidades cuando es empujado. Se otorgan 3 puntos a la extremidad cuando el animal ofrece resistencia al empuje pero el experimentador fue capaz de deslizarlo por el tapete de evaluación. Cuando el animal no se voltea, pero ofrece poca resistencia al empuje se otorgan 2 puntos a la extremidad. Cuando el experimentador es capaz de voltear al animal, pero éste vuelve a la cuadripedestación se otorga 1 punto. El animal recibe una puntuación de 0 cuando el experimentador logra voltearlo sin resistencia alguna y el animal no regresa a la cuadripedestación (Figura 19).

Las direcciones se califican de manera independiente, por lo que el puntaje máximo posible es de 8 puntos por cada animal en esta prueba.

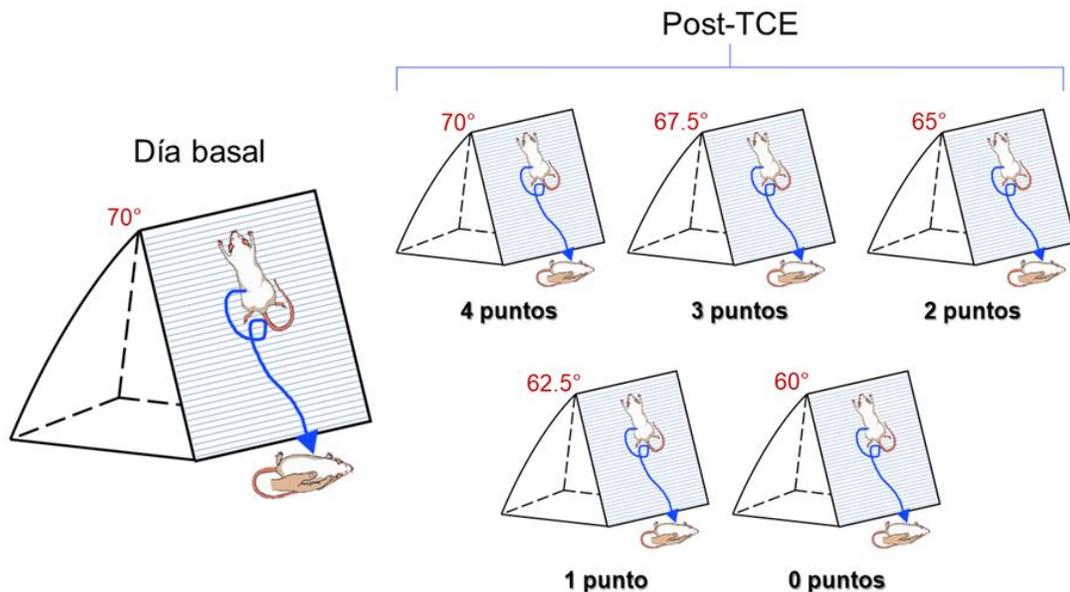


**Figura 19. Prueba de pulsión lateral del *neuroscore*.** Los animales son empujados de su parte lateral a lo largo del tapete de evaluación para probar su fuerza y resistencia al movimiento. La puntuación otorgada va desde 4 hasta 0, donde 4 representa una extensión normal y 0, una pérdida total de la función. Figura creada por Silvia Huerta en el programa Samsung Notes.

#### 6.5.1.4. Plano inclinado

En la prueba de plano inclinado, inicialmente se determina el ángulo máximo en el que el animal es capaz de sostenerse. Los animales se colocan en posición vertical, del lado izquierdo y del lado derecho sobre el tablero y se considera una respuesta exitosa cuando el animal logra sostenerse quieto durante 5 segundos en el tablero. Para determinar el ángulo máximo, el animal se coloca inicialmente en un tablero a 40° con respecto a la mesa y se van agregando 2.5% hasta que el animal ya no es capaz de sostenerse del tablero.

Para animales ya lesionados, el día de la prueba se colocan a 10° menos de su ángulo máximo. Los animales se califican en función del ángulo máximo inicial. Se otorgan 4 puntos cuando el animal mantiene su ángulo máximo, 3 puntos si el ángulo máximo disminuye 2.5°, 2 puntos cuando el ángulo máximo disminuye 5°, 1 punto cuando el ángulo máximo disminuye 7.5°, y 0 puntos cuando el ángulo máximo disminuye 10° o más. Para asignar el valor a esta prueba se realiza un promedio de las 3 posiciones de evaluación, por lo que el mayor puntaje posible es de 4 puntos por cada animal (vertical, izquierda, derecha) (Figura 20).

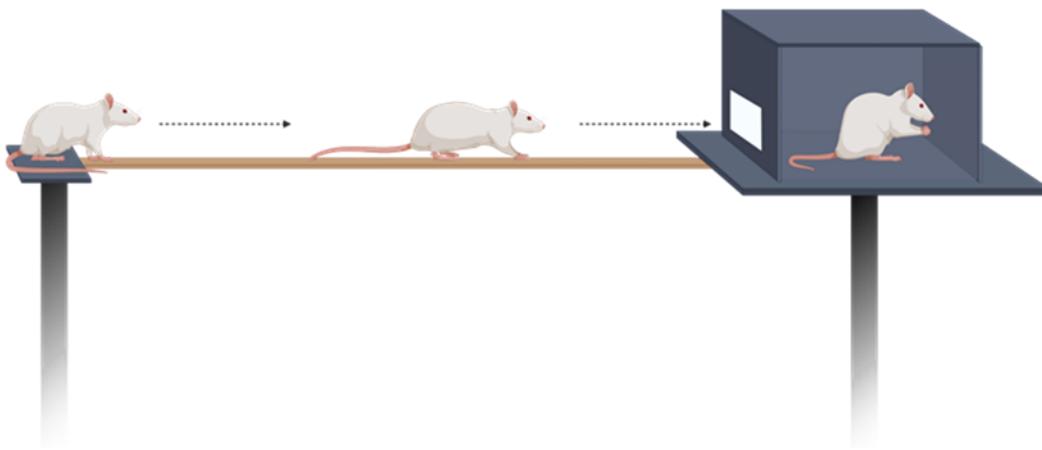


**Figura 20. Prueba de pulsión lateral del neuroscore.** Para la prueba del plano inclinado primero se determina el ángulo máximo al que el animal es capaz de sostenerse. Se evalúan la posición vertical, izquierda y derecha. El día de la prueba, los animales con TCE se colocan a 10° menos de su ángulo basal. En esta prueba, los animales se califican en función de los ángulos que pierda con respecto al día basal; siendo 4 puntos cuando mantiene el mismo ángulo y 0 puntos cuando pierde 10° o más. Figura creada por Silvia Huerta en el programa Samsung Notes.

### 6.5.2. Barra transversa

La prueba de barra transversa consiste en evaluar la capacidad de los animales para desplazarse a lo largo de una barra de madera de 2.5 cm de

ancho y 120 cm de largo colocada a 75 cm del suelo. Para esta prueba se coloca un estímulo aversivo en la plataforma inicial (lámpara) y una caja oscura en la plataforma final. En esta prueba se evalúan tanto el tiempo que le toma al animal llegar a la caja oscura desde la plataforma inicial como el desempeño que tienen al realizar el recorrido (Figura 21). La puntuación del recorrido se basa en la capacidad del animal para atravesar la barra de acuerdo a lo siguiente: 6 puntos cuando la rata atraviesa la barra sin problemas; 5 puntos cuando la rata atraviesa la barra y tiene de 1 a 3 resbalones; 4 puntos corresponden a 4 o más resbalones; 3 puntos se otorgan cuando la rata atraviesa la barra sin ayuda de alguna de sus extremidades; 2 puntos cuando la rata se cae mientras camina por la barra; 1 punto se asigna cuando la rata no es capaz de atravesar la barra pero no se cae; y 0 puntos cuando la rata se cae de la barra (Ohlsson & Johansson, 1995).

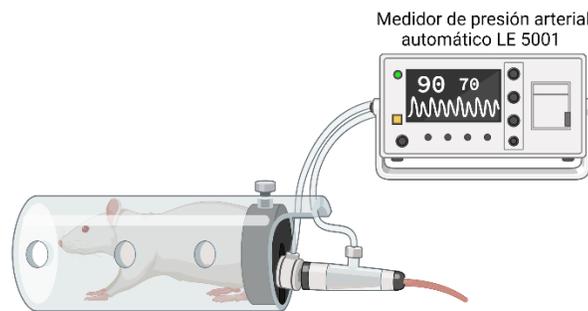


**Figura 21. Prueba de barra transversa.** Para esta prueba los animales son colocados en una plataforma inicial y se mide el tiempo y el desempeño que tienen para llegar a la caja oscura de seguridad. La puntuación del recorrido va desde 6 puntos cuando la rata cruza sin problemas, y 0 cuando el animal se cae de la barra. Figura creada con Biorender.com

## 6.6. Determinación de las variables hemodinámicas

Las variables hemodinámicas incluyeron la frecuencia cardíaca (FC), presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM). Las variables hemodinámicas fueron medidas por el método

pletismográfico usando un medidor de presión arterial automático LE 5001 (Letical, PanLab, Barcelona, España) (Figura 22). Para tal fin, los animales se inmovilizaron en restrictores de movimiento de acrílico, y la cola de los animales fue expuesta a una lámpara de calor durante 15 minutos. Después de ese periodo, se coloca un brazalete en la cola de los animales, mismo que posteriormente fue insuflado para detener el flujo sanguíneo; posteriormente, la tensión liberada permitió la medición las variables hemodinámicas a través de un sensor. Los animales fueron habituados a los restrictores de movimiento dos días consecutivos antes del día de la evaluación.



**Figura 22. Método pletismográfico para la medición de las variables hemodinámicas.** Los animales son mantenidos en un restritor de movimiento y se les coloca en la cola un brazalete que es insuflado para detener el pulso y medir las variables hemodinámicas con la tensión liberada. Figura creada con Biorender.com

### **6.7. Determinación de la actividad simpática en el modelo de la rata descerebrada y desmedulada**

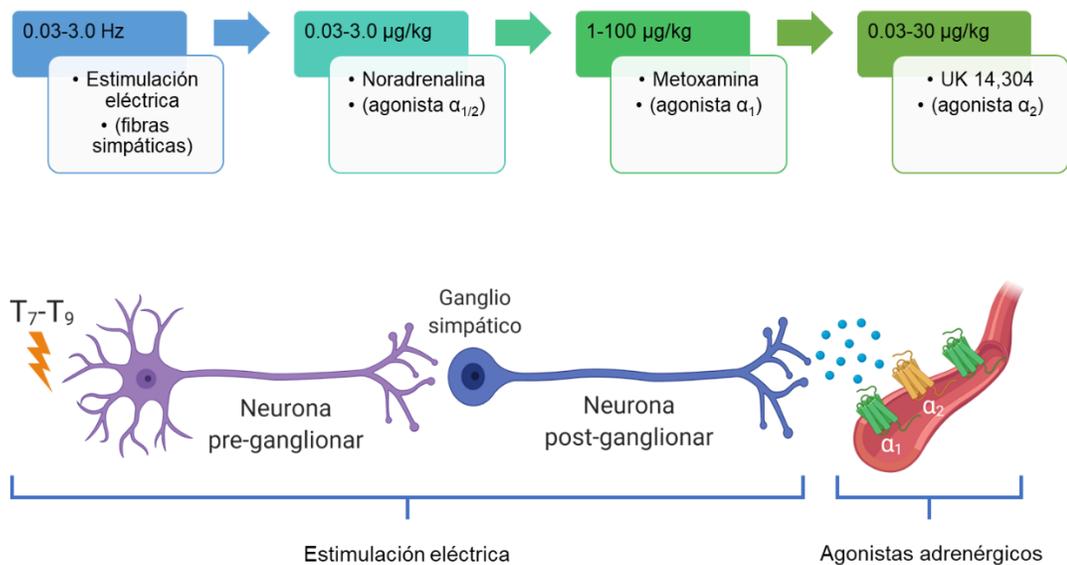
Los animales se anestesiaron con isoflurano al 3%. Una vez que se confirmó la anestesia a través de la ausencia de los reflejos podal, palpebral y flexión a la presión en la cola, se realizó una incisión en la parte ventral del cuello de los animales para exponer y canular la tráquea. Los animales se ventilaron artificialmente con aire ambiental usando 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, de acuerdo a lo descrito previamente (Kleinman & Radford, 1964). Posteriormente, los animales se descerebraron y desmedularon mediante la inserción de un estiléte de acero inoxidable a través

de la orbita ocular y el *foramen magnum* que fue deslizado por todo el canal vertebral con la finalidad de destruir el sistema nervioso central (Centurión et al., 2009; Gillespie & Muir, 1967). Una vez realizada la descerebración y desmedulación, los animales se dejaron estabilizar un periodo de 10 minutos para posteriormente realizar una vagotomía bilateral y la canulación de la vena femoral (para la administración de fármacos) y la carótida izquierda. La arteria carótida izquierda fue conectada a un transductor de presión (RX104A, Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA) que registra presión arterial y frecuencia cardiaca de manera simultánea usando una unidad de adquisición de datos (MP150A-CE, Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA) y el software Acqknowledge v4.0.1 (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA).

#### **6.7.1. Diseño experimental en las ratas descerebradas y desmedulada**

Después del procedimiento mencionado anteriormente, el estilete de acero inoxidable es remplazado por un electrodo bipolar que está aislado excepto por excepto 1 cm localizado a 9 cm de la punta. El segmento no aislado de 1 cm se colocó en la región T7-T9 de la médula espinal, ya que en esa región nacen los nervios simpáticos preganglionares que inervan a la vasculatura sistémica, lo que permite la estimulación eléctrica selectiva del tono simpático vasopresor (Gillespie & Muir, 1967). Previo a la estimulación eléctrica, los animales recibieron un bolo i.v. de galamina con la finalidad de evitar los espasmos musculares inducidos por la estimulación eléctrica. El tono simpático vasopresor se estimuló mediante un estimulador de pulsos cuadrados S88X (Grass Technologies, Warwick, RI, U.S.A.) aplicando trenes monofásicos de 10 s que consisten en pulsos cuadrados (2 ms, 60 V), a frecuencias de estimulación crecientes (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 Hz). Una vez que se completó la curva estímulo-respuesta, las respuestas vasopresoras inducidas por bolos i.v. de agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos se evaluaron de la siguiente manera: (1) noradrenalina exógena (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; agonista de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ; ligando endógeno); (2)

metoxamina (1, 3, 10, 30 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; agonista selectivo de los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ ); y (3) UK 14,304 (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; agonista selectivo de los receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ ) (Figura 23). El intervalo entre los diferentes estímulos o dosis depende de la duración de la respuesta vasopresora resultantes (aprox. 5-10 minutos). Después de cada curva dosis-respuesta, el sistema de cánulas en la vénula femoral se lavó para eliminar la presencia del fármaco. Se determinaron los cambios máximos en la PAD en respuesta a la estimulación eléctrica o los agonistas de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos. Se tomó en consideración la PAD ya que es la presión sanguínea sobre los vasos sanguíneos cuando el ventriculo izquierdo está relajado, de ahí que indirectamente representa la resistencia vascular sistémica.



**Figura 23. Protocolo experimental realizado en el modelo de rata descerebrada y desmedulada.** Para comenzar, se realizó una curva estímulo-respuesta para evaluar la reactividad de las fibras simpáticas. Posteriormente, se realizaron curvas dosis-respuesta a noradrenalina, metoxamina o UK 14,304 para evaluar la funcionalidad de los receptores adrenérgicos localizados en los vasos sanguíneos. Figura creada con Biorender.com

## 6.8. Fármacos

Aparte de los anestésicos Ketamina (Anestek®, PiSA Agropecuaria, Jal, México), Xilazina (Procin®, PiSA Agropecuaria, Jal, México) e Isoflurano (Fluriso™, Vet Ones, Boise, ID, U.S.A.), los compuestos utilizados en el presente estudio (obtenidos de las fuentes indicadas) fueron: trietioduro de galamina; (±)-bitartrato de noradrenalina, clorhidrato de metoxamina, UK 14,304, y sulfhidrato de sodio monohidratado (NaHS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.). La noradrenalina, metoxamina y galamina fueron disueltas en solución salina fisiológica. El UK 14,304 fue disuelto en DMSO 0.1 %. El NaHS, donador de H<sub>2</sub>S, fue disuelto en PBS, pH 7.4 y 25 °C. Para el tratamiento farmacológico con NaHS se prepararon soluciones nuevas todos los días.

## 6.9. Análisis estadístico

Los datos de la expresión proteica son presentados en cajas que muestran la media y los cuartiles 25 y 75, con bigotes que representan el valor mínimo y máximo. Los datos de la presión arterial y la actividad del tono simpático vasopresor, así como las tablas, se muestran como la media ± el error estándar de la media.

Para la comparación del grupo *sham* contra el grupo TCE + PBS y la comparación de TCE moderado contra severo se utilizó una prueba de t-test. Los datos de la intensidad del traumatismo y el neuroscore de los grupos tratados fueron comparados mediante una prueba de ANOVA de una vía con prueba *post-hoc* de Tukey.

Las diferencias en la expresión proteica en el curso temporal del grupo TCE + PBS se evaluaron por análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba *post-hoc* de Dunnet usando el grupo *sham* como control. El efecto del tratamiento subcrónico con NaHS se evaluó por medio de una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.

Las diferencias en las variables hemodinámicas entre los grupos de animales se evaluaron mediante una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnet utilizando el grupo PBS como control.

Las diferencias en los cambios de la PAD entre los distintos grupos de animales, así como el resultado de la evaluación sensoriomotora, se compararon por medio de una ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.

Las figuras se elaboraron con el software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA); mientras que el análisis estadístico se realizó en el software SigmaPlot v12.0 (Systat Software, Inc.). En todos los casos se aceptó una significancia estadística cuando  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Alteraciones inducidas por el TCE severo

En todos los grupos experimentales, los animales obtuvieron una puntuación inicial de 26-28 puntos antes de la inducción del TCE severo. Los animales con una puntuación basal menor a 26 fueron excluidos del estudio. Cabe resaltar que los animales incluidos en el grupo sham tuvieron una puntuación de  $26.8 \pm 0.4$  puntos. En la tabla 6, se puede observar que no existen diferencias significativas entre la presión del golpe ( $F_{(6, 21)}=0.09293$ ;  $p=0.9964$ ) o el *neuroscore* ( $F_{(6, 21)}=1.033$ ;  $p=0.4322$ ) entre los grupos experimentales correspondientes a los distintos días de evaluación.

**Tabla 5. Información de la presión del golpe (atm) y el *neuroscore* en los grupos utilizados para la caracterización de los cambios en la expresión proteica de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S inducidos por el TCE severo.**

	Días post-TCE									
	1		2		3		7		28	
	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS
<b>Media</b>	2.9	14.5	3.0	14.5	2.8	11.0	3.0	12.5	3.0	13.5
<b>S.D.</b>	0.1	1.3	0.5	3.4	0.7	6.6	0.5	3.1	0.6	1.0
<b>S.E.M.</b>	0.02	0.6	0.2	1.7	0.3	3.3	0.3	1.5	0.3	0.5

Cada valor representa el promedio de 6 animales  $\pm$  eem por grupo. La presión se muestra en atmósferas y el *neuroscore* en puntos. NS, *neuroscore* 2 días post-TCE; TCE, traumatismo craneoencefálico

Por otra parte, en los grupos que se utilizaron para la caracterización de los cambios hemodinámicos y sensoriomotores inducidos por el TCE, los animales incluidos en el grupo sham tuvieron una puntuación de  $27.2 \pm 0.2$  puntos. Se puede observar, en la Tabla 7, que no hay diferencias significativas entre la presión del golpe de cada severidad ( $t=1.508$ ,  $df=13$ ;  $p=0.1554$ ). Acorde con la presión del golpe, los animales podrían ser clasificados como TCE severo. Sin embargo, al realizar la prueba de *neuroscore* al día 2 los animales se clasificaron en moderado y severo. El *neuroscore* del grupo de TCE severo fue significativamente más bajo comparado con el grupo de TCE

moderado ( $t=4.695$ ,  $df=13$ ;  $p=0.0004$ ). Los animales se dividieron por severidad para evaluar las variables hemodinámicas con el propósito de excluir los efectos de la severidad en las pruebas realizadas (Tabla 7).

**Tabla 6. Información de la presión del golpe (atm) y el *neuroscore* en los grupos utilizados para la caracterización de los cambios hemodinámicos y sensoriomotores inducidos por el TCE.**

	TCE moderado		TCE severo	
	Presión	NS	Presión	NS
<b>Media</b>	3.17	18.00***	3.39	12.13
<b>S.D.</b>	0.50	1.63	0.76	3.091
<b>S.E.M.</b>	0.19	0.62	0.27	1.093

Cada valor representa el promedio de 8 animales  $\pm$  eem por grupo. La presión se muestra en atmósferas y el *neuroscore* en puntos NS, *neuroscore* 2 días post-TCE; TCE, traumatismo craneoencefálico. \*\*\*,  $p < 0.001$  vs severo por t-test.

Además, los animales incluidos en el grupo sham para la estandarización de los cambios post-TCE severo en la actividad simpática tuvieron una puntuación de  $26.7 \pm 0.3$  puntos. No existió diferencia significativa entre la presión del golpe ( $F_{(3,20)} = 0.602$ ;  $p = 0.621$ ) o el *neuroscore* ( $F_{(3, 19)} = 0.2244$ ;  $p=0.8782$ ) al día 2 en los grupos utilizados (Tabla 8).

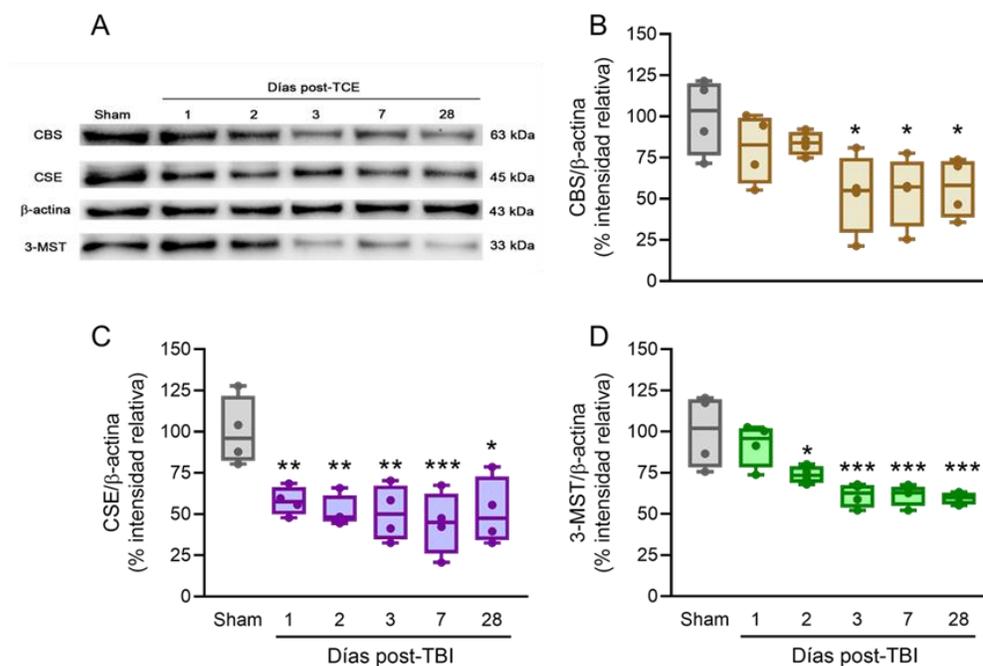
**Tabla 7. Información de la presión del golpe (atm) y el *neuroscore* en los grupos utilizados para la caracterización de los cambios hemodinámicos y sensoriomotores inducidos por el TCE severo.**

	Días post-TCE							
	7		14		21		28	
	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS
<b>Media</b>	3.02	16.17	3.13	15.67	3.46	16.33	3.24	15.17
<b>S.D.</b>	0.53	2.04	0.18	2.25	1.03	2.06	0.48	2.71
<b>S.E.M.</b>	0.21	0.83	0.10	0.92	0.42	0.84	0.20	1.11

Cada valor representa el promedio de 8 animales  $\pm$  eem por grupo. La presión se muestra en atmósferas y el *neuroscore* en puntos NS, *neuroscore* 2 días post-TCE; TCE, traumatismo craneoencefálico. \*\*\*,  $p < 0.001$  vs severo por t-test.

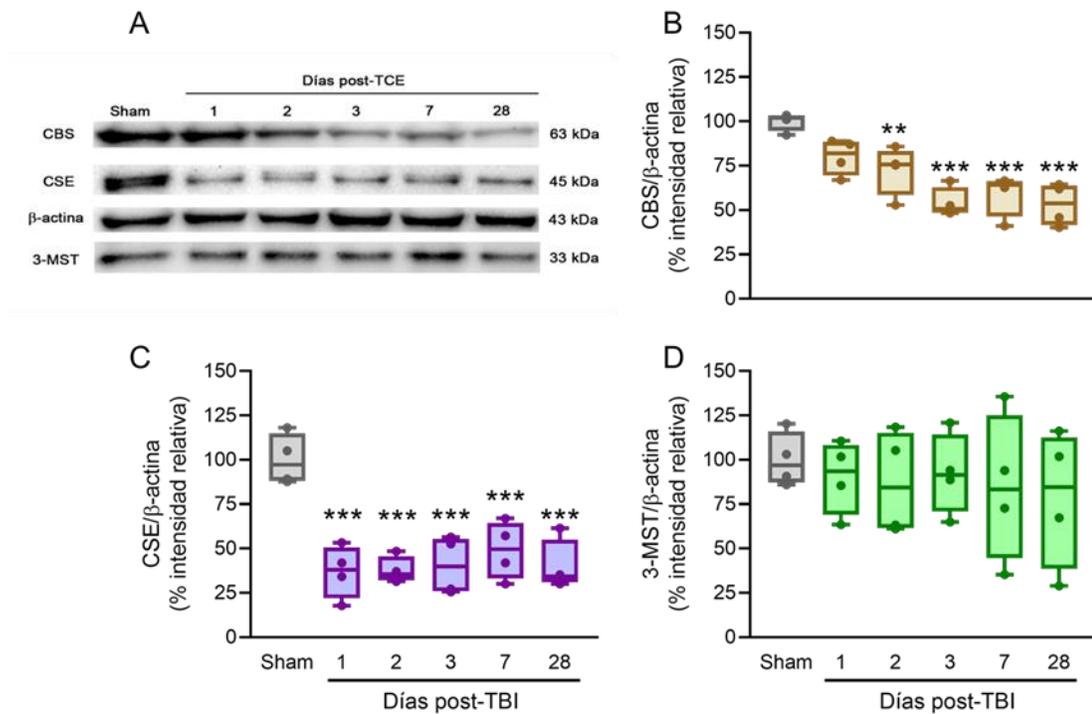
### 7.1.1. Expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el tallo y el hipotálamo

En la Figura 24 se muestra la imagen representativa (Figura 24A) del curso temporal de la expresión proteica de la CBS (Figura 24B), CSE (Figura 24C) y 3-MST (Figura 24D) en el hipotálamo de animales sometidos al TCE severo después de 1, 2, 3, 7 y 28 días. Se observa que el TCE severo redujo la expresión de: (1) la enzima CBS a partir del día 3 post-TCE ( $F_{(5, 18)}=3.744$ ;  $p=0.0169$ ; día 3, 47%,  $p = 0.0165$ ; día 7, 46%,  $0.0200$ ; día 28, 44%,  $p=0.0275$ ); (2) la enzima CSE a partir del día 1 post-TCE ( $F_{(5, 18)}=3.744$ ;  $p=0.0169$ ; día 1, 43%,  $p=0.0094$ ; día 2, 49%,  $p=0.0030$ ; día 3, 50%,  $p = 0.0025$ ; día 7, 56%,  $p=0.0008$ ; día 28, 49%,  $p=0.0029$ ); y (3) la enzima 3-MST a partir del día 2 post-TCE ( $F_{(5, 18)}=9.039$ ;  $p=0.0002$ ; día 2, 27%,  $p=0.0208$ ; día 3, 39%,  $p = 0.0008$ ; día 7, 39%,  $p=0.0008$ ; día 28, 49%,  $p=0.0005$ ). La disminución en la expresión de las tres enzimas se mantuvo hasta el día 28 post-TCE.



**Figura 24. Expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el hipotálamo después del TCE severo.** Imagen representativa (A), CBS (B), CSE (C), 3-MST (D). Cada caja representa la media y los cuartiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95 de 4 animales. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs *Sham* por ANOVA de una vía de con prueba *post-hoc* de Dunnet con el grupo *sham* como grupo control.

La Figura 25 muestra la imagen representativa del curso temporal de la expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S (Figura 25A) en el tallo cerebral. En la Figura 25B se observa la disminución en la expresión de la enzima CBS desde el día 2 post-TCE y hasta el día 28 ( $F_{(5, 18)}=11.68$ ;  $p<0.0001$ ; día 2, 28%,  $p=0.0078$ ; día 3, 46%,  $p<0.0001$ ; día 7, 41%,  $p=0.0002$ ; día 28, 47%,  $p<0.0001$ ). Por otra parte, la disminución en la expresión de la enzima CSE (Figura 25C) se presentó desde el día 1 post-TCE y se mantuvo hasta el día 28 ( $F_{(5, 18)}=11.82$ ;  $p<0.0001$ ; día 1, 64%,  $p<0.0001$ ; día 2, 63%,  $p<0.0001$ ; día 3, 60%,  $p<0.0001$ ; día 7, 52%,  $p=0.0004$ ; día 28, 60%,  $p<0.0001$ ). Sin embargo, no se encontraron cambios significativos en la expresión de la enzima 3-MST en el tallo cerebral después del TCE severo ( $F_{(5, 18)}=11.82$ ;  $p<0.0001$ ) (Figura 25D).



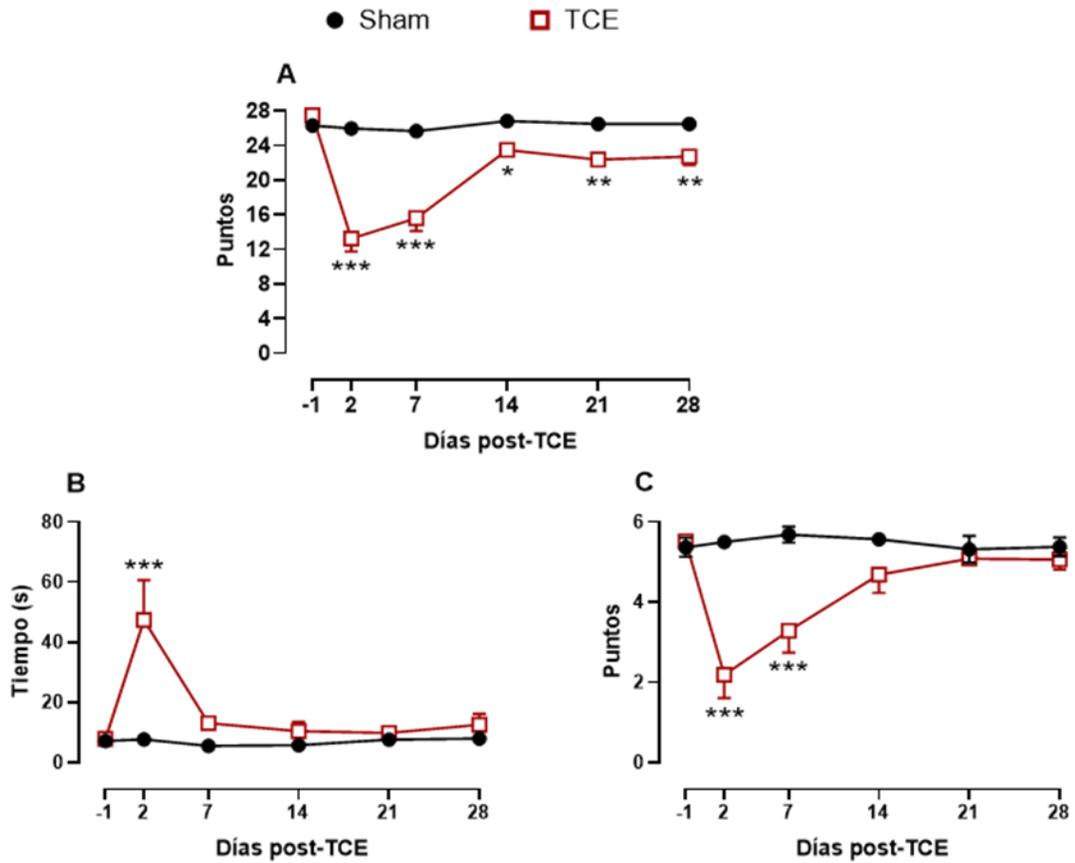
**Figura 25. Expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el tallo después del TCE severo.** Imagen representativa (A), CBS (B), CSE (C), 3-MST (D). Cada caja representa la media y los cuartiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95 de 4 animales. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs Sham por ANOVA de una vía de con prueba *post-hoc* de Dunnet con el grupo sham como grupo control.

### 7.1.2. Función sensoriomotora y peso corporal

En la Figura 26 se presentan los puntajes obtenidos en la prueba de *neuroscore* y la barra transversa antes (basal) y a los 2, 7, 14, 21 y 28 días después del TCE severo. Se puede observar que los puntos obtenidos en el *neuroscore* en el grupo *sham* permanecieron sin cambios significativos a lo largo del protocolo experimental, con una puntuación entre 26 y 28 puntos para todos los casos, lo que representa una función sensoriomotora normal. De manera interesante, se observó una disminución significativa del desempeño en el *neuroscore* a los días 2, 7, 14, 21 y 28 después del TCE ( $F_{(1,5)} = 15.635$ ;  $p < 0.001$ ; día 2, 61%,  $p < 0.001$ ; día 7, 20%,  $p < 0.001$ ; día 14, 26%,  $p = 0.012$ ; día 21, 12%,  $p = 0.002$ ; día 28, 15%,  $p = 0.005$ ). A pesar de que se observó una recuperación dependiente del tiempo, los animales con TCE severo no alcanzaron los valores del grupo *sham* (día 2,  $p < 0.001$ ; día 7,  $p < 0.001$ ; día 14,  $p < 0.001$ ; día 21,  $p = 0.001$ ; día 28,  $p < 0.001$ ; Figura 26A). Respecto a la barra transversa, el tiempo que les toma a los animales cruzar la barra se mantuvo normal a lo largo de los días de evaluación para el grupo *sham* y fue significativamente más alto 2 días después del TCE comparado contra el grupo *sham* ( $F_{(1,5)} = 13.667$ ;  $p < 0.001$ ; día 2, 67%,  $p < 0.001$ ; Figura 26B). Similar al tiempo, el desempeño en la barra transversa se mantuvo constante y normal a lo largo del tiempo en el grupo *sham* con una disminución significativa a los días 2 (59%;  $p < 0.001$ ), 7 (28%;  $p < 0.001$ ), y 14 (15%;  $p = 0.016$ ) después del TCE que se restauró por completo al día 21 (día 21,  $p = 0.130$ ; día 28,  $p = 0.069$ ; Figura 26C).

Además, en el grupo *sham*, la cirugía indujo una disminución en el peso corporal que fue evidente desde el día 2 y hasta el día 3 (día 1, 4%; día 2, 3%; día 3, 0.4 %). Por otra parte, el TCE severo indujo una disminución en el peso corporal ( $F_{(1,5)} = 149.793$ ;  $p < 0.001$ ) que es significativa desde el día 2 y hasta el día 28 post-TCE comparado con el grupo *sham* (día 2, 11%,  $p = 0.003$ ; día 3, 13%,  $p < 0.001$ ; día 4, 12%,  $p = 0.001$ ; día 5, 11%,  $p = 0.004$ ; día 6, 11%,  $p = 0.002$ ;

día 7, 11%,  $p=0.002$ ; día 14, 20%,  $p<0.001$ ; día 21, 18%,  $p<0.001$ ; día 28, 28%,  $p<0.001$ ; Figura 27).



**Figura 26. Disfunción sensoriomotora post-TCE severo.** (A) *neuroscore*; (B) tiempo al cruzar la barra; (C) desempeño al cruzar la barra. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs *sham* por ANOVA de dos vías con *post-hoc* de Tukey.

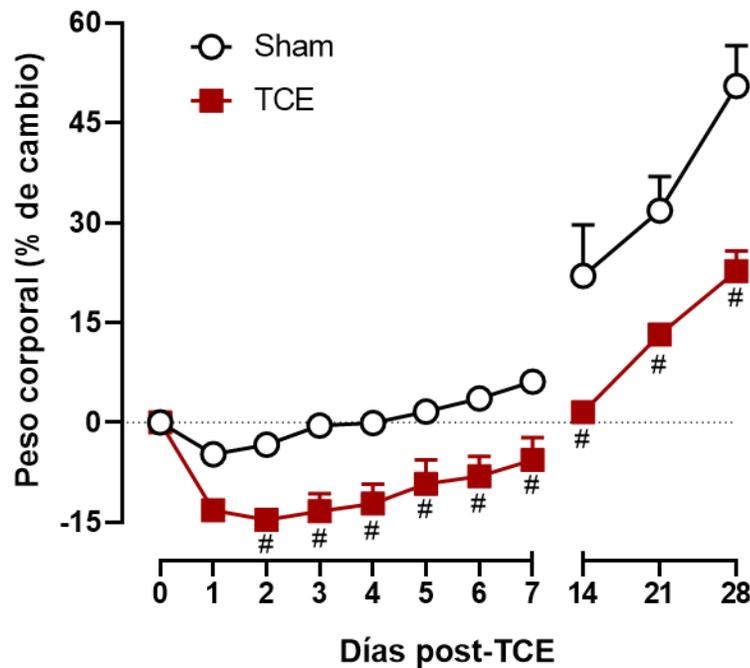


Figura 27. Registro del peso corporal post-TCE severo.

### 7.1.3. Variables hemodinámicas

En la Figura 28 se muestran las variables hemodinámicas de los grupos *sham* y con TCE moderado y severo. Los animales *sham* tuvieron valores fisiológicos de frecuencia cardíaca (día 7,  $327 \pm 7$  latidos por minuto [lpm]; día 14,  $332 \pm 7$  lpm; día 21,  $342 \pm 14$  lpm; día 28,  $384 \pm 12$  latidos por minuto [lpm]; Figura 28A), presión arterial sistólica (día 7,  $115 \pm 2$  mmHg; día 14,  $105 \pm 1$  mmHg; día 21,  $118 \pm 2$  mmHg; día 28,  $122 \pm 2$  mmHg; Figura 28B), presión arterial diastólica (día 7,  $84 \pm 2$  mmHg; día 14,  $78 \pm 1$  mmHg; día 21,  $89 \pm 4$  mmHg; día 28,  $87 \pm 4$  mmHg; Figura 28C), y presión arterial media (día 7,  $94 \pm 1$  mmHg; día 14,  $87 \pm 1$  mmHg; día 21,  $100 \pm 4$  mmHg; día 28,  $100 \pm 4$  mmHg; Figura 28D) durante todo los días de evaluación.

Como se mencionó previamente, los animales con TCE se separaron en moderado y severo para excluir el efecto de la severidad en las variables hemodinámicas. De manera interesante, se observó un incremento significativo en la frecuencia cardíaca al día 7 y 14 (día 7, 20%;  $p=0.020$ ; día

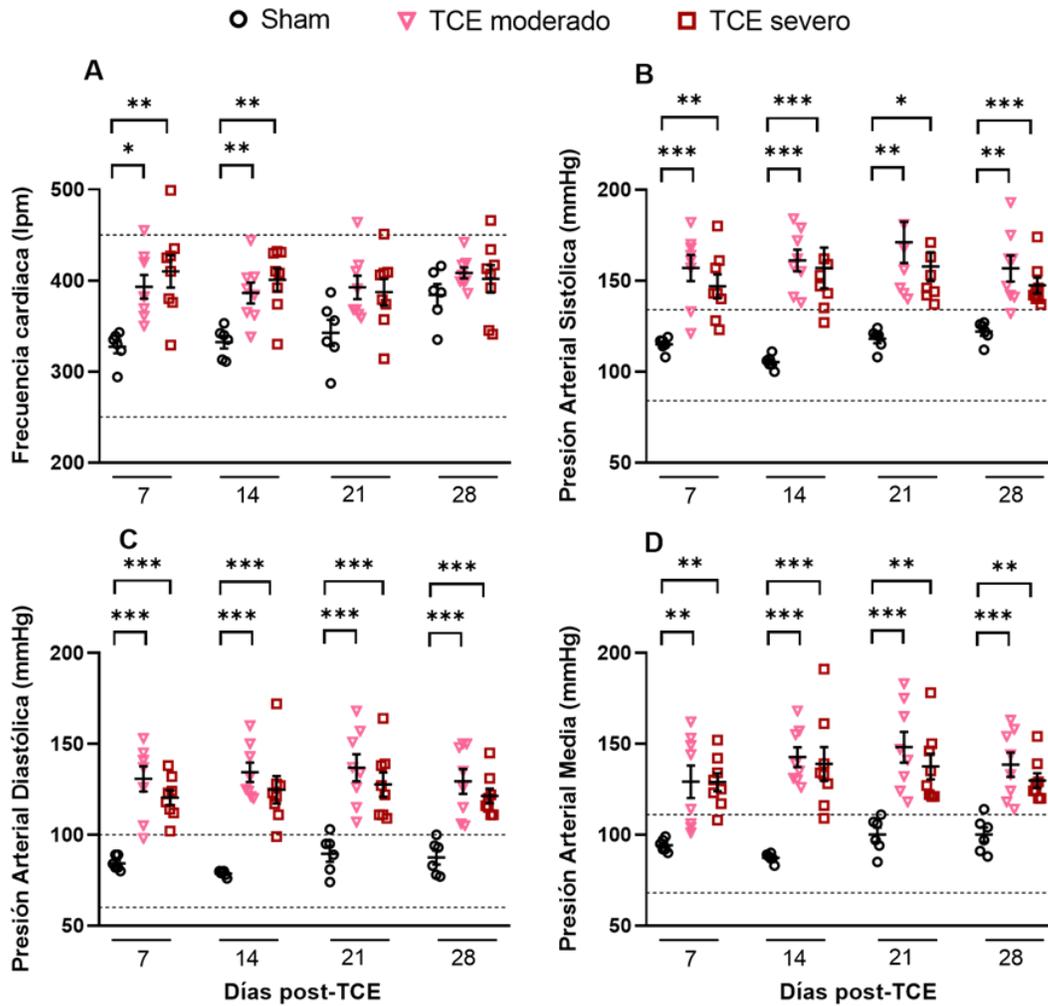
14, 26% $p = 0.007$ ) en los grupos de TCE moderado y severo cuando se comparan contra el grupo *sham*. Además, no existieron diferencias significativas entre ambas severidades de TCE ( $F_{(1,3)} = 0.277$ ;  $p = 0.600$ ). El incremento en la frecuencia cardiaca inducido por el TCE moderado y severo fue transitorio y la frecuencia cardiaca se restableció a los días 21 y 28 después del TCE (día 21,  $p > 0.999$ ; día 28,  $p > 0.999$ ; Figura 28A).

Por otra parte, el TCE fue capaz de incrementar la presión arterial sistólica, diastólica y media a partir del día 7 y hasta el día 28 post-TCE (PAS: día 7, 46%,  $p < 0.001$ ; día 14, 47%,  $p < 0.001$ ; día 21, 30%,  $p < 0.001$ ; día 28, 20%,  $p = 0.004$ ; PAD: día 7, 63%,  $p < 0.001$ ; día 14, 56%,  $p < 0.001$ ; día 21, 42%,  $p < 0.001$ ; día 28, 40%,  $p = 0.004$ ; PAM: día 7, 46%,  $p < 0.001$ ; día 14, 52%,  $p < 0.001$ ; día 21, 36%,  $p < 0.001$ ; día 28, 31%,  $p = 0.004$ ). Al respecto, no se encontraron diferencias significativas cuando se comparó el TCE moderado contra el TCE severo (PAS, ( $F_{(1,3)} = 0.114$ ;  $p = 0.951$ ); PAD ( $F_{(1,3)} = 0.013$ ;  $p = 0.998$ ); PAM, ( $F_{(1,3)} = 0.222$ ;  $p = 0.881$ ; Figuras 28B, 28C, y 28D).

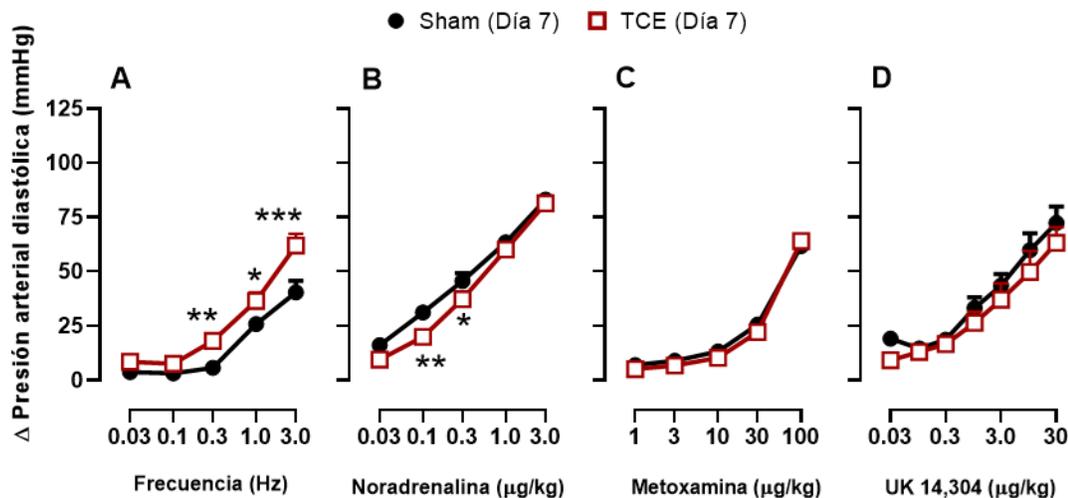
#### 7.1.4. Actividad del tono simpático vasopresor

En la Figura 28 se muestra que la estimulación del tono simpático vasopresor, la administración de noradrenalina (agonista  $\alpha_{1/2}$ ), metoxamina (agonista selectivo  $\alpha_1$ ) y UK 14,304 (agonista selectivo  $\alpha_2$ ) produjeron respuestas vasopresoras dependientes de la frecuencia de estimulación o de la dosis; asimismo se mantuvieron constantes en el grupo *sham* a lo largo de los tiempos de evaluación. Como se observa en la Figura 28A, 7 días después del TCE severo se observó un incremento significativo de las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (0.3 Hz, 215%; 1.0 Hz, 83%; 3.0 Hz, 41%;  $F_{(1,4)} = 2.835$ ;  $p = 0.034$ ), lo cual sugiere un incremento en la actividad del tono simpático. En contraste, las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina se redujeron significativamente ( $F_{(1,4)} = 15.613$ ;  $p < 0.001$ ; Figura 28B; 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 35% y 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 29%) sin que se afectaran las respuestas inducidas por metoxamina y UK 14,304 (metoxamina,  $F$

(1,4)=0.477,  $p=0.753$ ; UK 14,304,  $F_{(1,6)}=0.200$ ;  $p=0.976$ ; Figuras 28C y 28D, respectivamente).



**Figura 28. Alteraciones hemodinámicas en animales despiertos después del TCE moderado y severo.** (A) Frecuencia cardíaca; (B) Presión arterial sistólica; (C) Presión arterial diastólica; (D) Presión arterial media. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales (*sham*) u 8 animales (TCE). Las líneas punteadas representan los valores fisiológicos. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs *sham* por ANOVA de dos vías con *post-hoc* de Tukey.

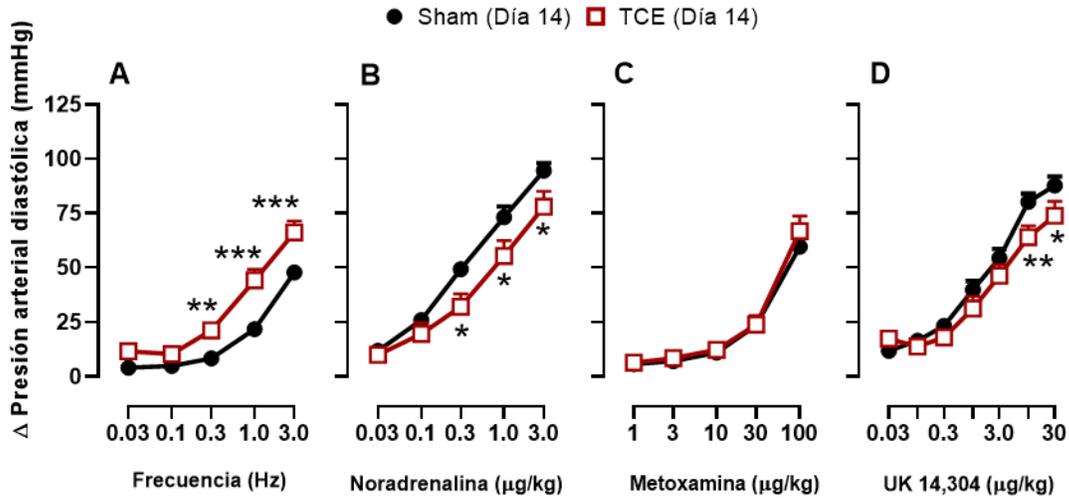


**Figura 29. Alteraciones inducidas por el TCE severo sobre las respuestas vasopresoras al día 7 post-TCE.** Efecto del TCE sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (A), noradrenalina (B), metoxamina (C) y UK 14,304 (D) 7 días post-TCE. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs sham por ANOVA de dos vías de con prueba *post-hoc* de Tukey.

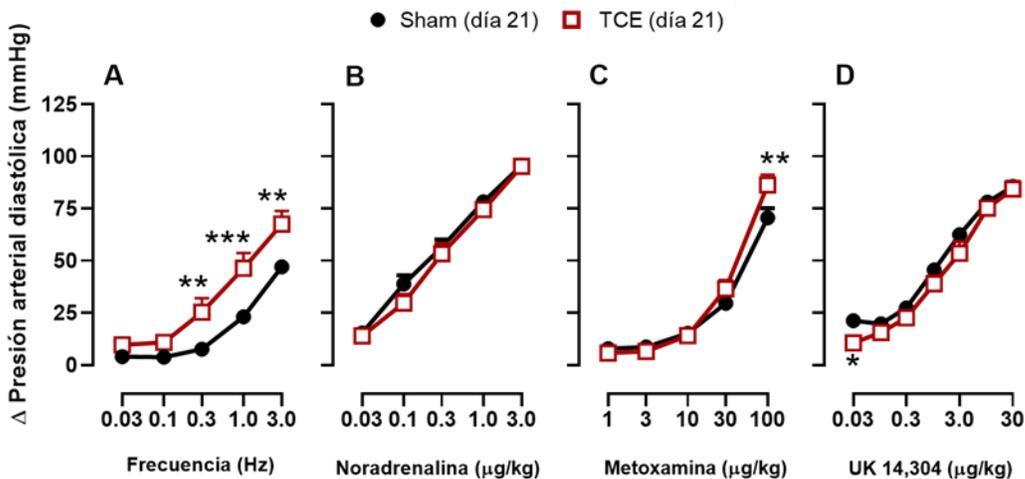
Al día 14 posteriores al TCE se observó que las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica se mantienen incrementadas de manera significativa ( $F_{(1,4)}=2.629$ ;  $p=0.047$ ; Figura 30A; 0.3 Hz, 152%; 1.0 Hz, 103%; 3.0 Hz, 38%). Además, las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina ( $F_{(1,4)}=14.734$ ;  $p<0.001$ ; Figura 30B; 0.3 µg/kg, 35%; 1.0 µg/kg, 24 %; 3 µg/kg, 17%) disminuyeron significativamente sin que se modificaran las respuestas inducidas por metoxamina ( $F_{(1,4)}=0.239$ ;  $p=0.915$ ; Figura 30C). Mientras que las respuestas vasopresoras inducidas por UK 14,304 disminuyeron de manera significativa, particularmente a las dosis de 10 y 30 µg/kg ( $F_{(1,6)}=9.716$ ;  $p=0.003$ ; Figura 30D; 10 µg/kg, 20%; 30 µg/kg, 16%).

A los 21 días después del TCE severo, las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica incrementaron de manera significativa ( $F_{(1,4)}=32.702$ ;  $p<0.001$ ; Figura 31A; 0.3 Hz, 232%; 1.0 Hz, 101%; 3.0 Hz, 43%). Por otra parte, las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina se vieron restauradas ( $F_{(1,4)}=0.516$ ;  $p=0.725$ ; Figura 31B). Además, se observó un incremento significativo en las respuestas vasopresoras inducidas por

metoxamina únicamente a la dosis de 100 µg/kg (22%;  $F_{(1,4)}=2.737$ ;  $p=0.104$ ; Figura 31B;) con una ligera disminución de las respuestas inducidas por UK 14,304 a la dosis de 0.03 y 3.0 µg/kg ( $F_{(1,6)}=0.639$ ;  $p=0.699$ ; Figura 31D; 0.03 µg/kg, 51%; 3.0 µg/kg, 14%).

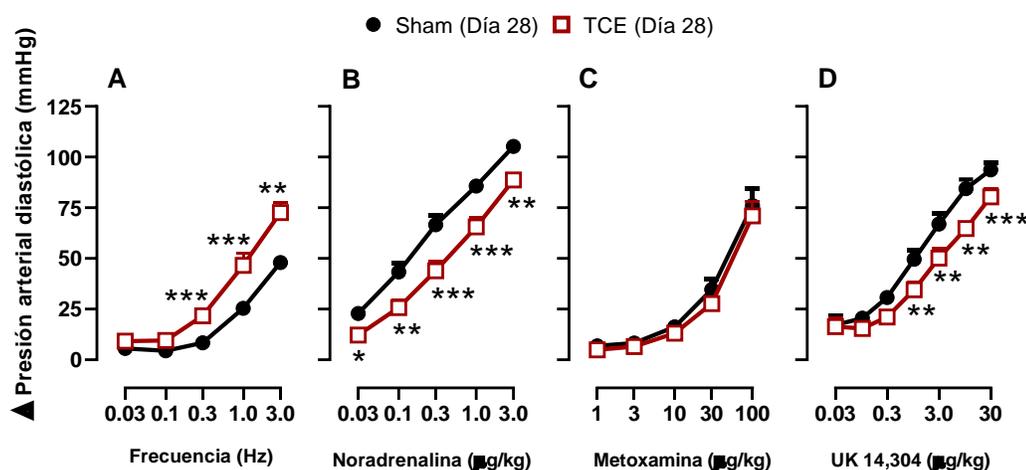


**Figura 30. Alteraciones inducidas por el TCE severo sobre las respuestas vasopresoras al día 14 post-TCE.** Efecto del TCE sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (A), noradrenalina (B), metoxamina (C) y UK 14,304 (D) 14 días post-TCE. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs sham por ANOVA de dos vías de con prueba *post-hoc* de Tukey.



**Figura 31. Alteraciones inducidas por el TCE severo sobre las respuestas vasopresoras al día 21 post-TCE.** Efecto del TCE sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (A), noradrenalina (B), metoxamina (C) y UK 14,304 (D) 21 días post-TCE. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs sham por ANOVA de dos vías de con prueba *post-hoc* de Tukey.

Por último, al día 28 post-TCE severo, se mantuvo el incremento significativo de las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica ( $F_{(1,4)}=51.356$ ;  $p<0.001$ ; Figura 32A; 0.3 Hz, 25%; 1.0 Hz, 83% 3.0 Hz, 53%). Adicionalmente, las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina vuelven a estar disminuidas de manera significativa ( $F_{(1,4)}=58.150$ ;  $p<0.001$ ; Figura 32B; 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 46%; 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 41%; 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 33%; 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 23%; 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 16%); mientras que las respuestas vasopresoras inducidas por metoxamina se restauran por completo ( $F_{(1,4)}=0.140$ ;  $p=0.967$ ; Figura 32C). Además, las respuestas vasopresoras inducidas por UK 14,304 disminuyen significativamente a las dosis de 1-30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $F_{(1,6)}=30.348$ ;  $p<0.001$ ; Figura 32D; 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 30%; 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 25%; 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 23%; 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 14%).



**Figura 32. Alteraciones inducidas por el TCE severo sobre las respuestas vasopresoras.** Efecto del TCE sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (A), noradrenalina (B), metoxamina (C) y UK 14,304 (D) 28 días post-TCE. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs sham por ANOVA de dos vías de con prueba *post-hoc* de Tukey.

### 7.1.5. Resumen de resultados del experimento 1

Con estos resultados se demuestra que el TCE severo induce una disminución de la expresión de la enzima CBS, CSE y 3-MST en el hipotálamo, y de la enzima CBS y CSE en el tallo cerebral. Dichos cambios se presentan a

distintos días después del TCE, pero permanecen hasta el día 28 post-TCE (Figura 33).

Además, el TCE severo induce disfunción sensoriomotora, alteraciones en la coordinación motora y pérdida de peso, tal y como se ha reportado previamente (Santiago-Castañeda et al., 2020; Segovia-Oropeza et al., 2020; Sell et al., 2017).

Además, este estudio sugiere que los cambios en las variables hemodinámicas (frecuencia cardíaca y presión arterial) que se presentan como consecuencia del TCE no dependen de la severidad del trauma y perduran desde el día 7 y hasta el día 28 post-TCE (Figura 33).

Por último, el modelo in situ de la rata descerebrada y desmedulada permite sugerir que la actividad del sistema nervioso simpático se encuentra incrementada desde el día 7 y hasta el día 28 en los animales sometidos al TCE severo. Estas alteraciones en el tono simpático vasopresor se acompañan por una disminución de la función de los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, particularmente los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos (Figura 33).

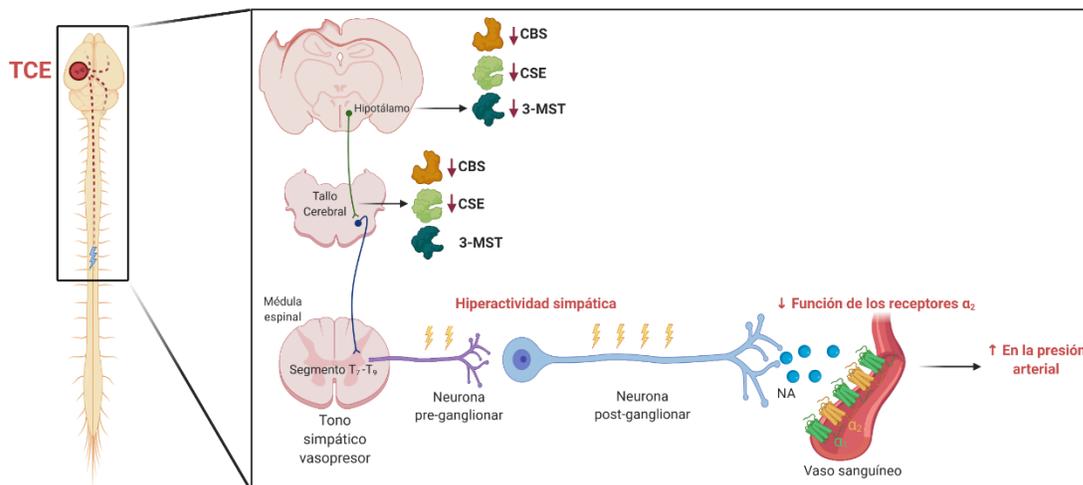


Figura 33. Resumen de resultados del experimento 1.

## 7.2. Efecto del NaHS en las alteraciones inducidas por el TCE

En todos los grupos experimentales, los animales obtuvieron una puntuación inicial de 26-28 puntos antes de la inducción del TCE severo. Los animales con una puntuación basal menor a 26 fueron excluidos del estudio. Cabe resaltar que los animales incluidos en el grupo sham tuvieron una puntuación de  $26.8 \pm 0.4$  puntos. En la tabla 9, se puede observar que no existen diferencias significativas entre la presión del golpe ( $F_{(3, 12)}=0.05989$ ;  $p=0.9799$ ) o el *neuroscore* ( $F_{(3, 12)}=2.521$ ;  $p=0.1072$ ) entre los grupos que se utilizaron para determinar el efecto de la administración de NaHS en los cambios de la expresión proteica inducidos por el TCE severo.

**Tabla 8. Información de la presión del golpe (atm) y *neuroscore* en los grupos que se utilizaron para evaluar el efecto de la administración de NaHS en los cambios de la expresión proteica inducidos por el TCE severo.**

	Días post-TCE							
	7				28			
	PBS (1 ml/kg)		NaHS (3.1 mg/kg)		PBS (1 ml/kg)		NaHS (3.1 mg/kg)	
	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS
<b>Media</b>	3.0	12.5	2.9	15.8	3.0	13.5	2.9	15.0
<b>S.D.</b>	0.5	3.1	0.4	1.0	0.6	1.0	0.1	1.4
<b>S.E.M.</b>	0.3	1.5	0.2	0.5	0.3	0.5	0.1	0.2

Cada valor representa el promedio de 6 animales  $\pm$  eem. PBS, buffer de fosfatos (vehículo del NaHS). La presión se muestra en atmósferas y el *neuroscore* en puntos. NS, *neuroscore* 2 días post-TCE; TCE, traumatismo craneoencefálico.

Por otra parte, en los grupos que se utilizaron para la evaluación del efecto del NaHS sobre las variables hemodinámicas y la actividad simpática después del TCE, los animales incluidos en el grupo sham tuvieron una puntuación de  $27.2 \pm 0.2$  puntos. Se puede observar, en la Tabla 7, que no hay diferencias significativas entre la presión del golpe ( $F_{(3,20)}=2.546$ ;  $p=0.080$ ) o el *neuroscore* ( $F_{(3, 19)}=1.298$ ;  $p=0.2981$ ) al día 2 entre los grupos utilizados para este objetivo (Tabla 10).

**Tabla 9. Información de la presión del golpe (atm) y *neuroscore* en los grupos que se utilizaron para evaluar el efecto de la administración de NaHS en las alteraciones hemodinámicas y simpáticas post-TCE.**

	TCE + PBS (1 ml/kg)		TCE + NaHS (1.8 mg/kg)		TCE + NaHS (3.1 mg/kg)		TCE + NaHS (5.6 mg/kg)	
	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS	Presión	NS
<b>Media</b>	3.19	16.0	2.17	15.86	2.64	16.57	3.10	13.86
<b>S.D.</b>	0.88	2.24	0.47	2.61	0.84	2.15	0.68	3.72
<b>S.E.M.</b>	0.33	0.85	0.17	0.99	0.32	0.81	0.26	1.40

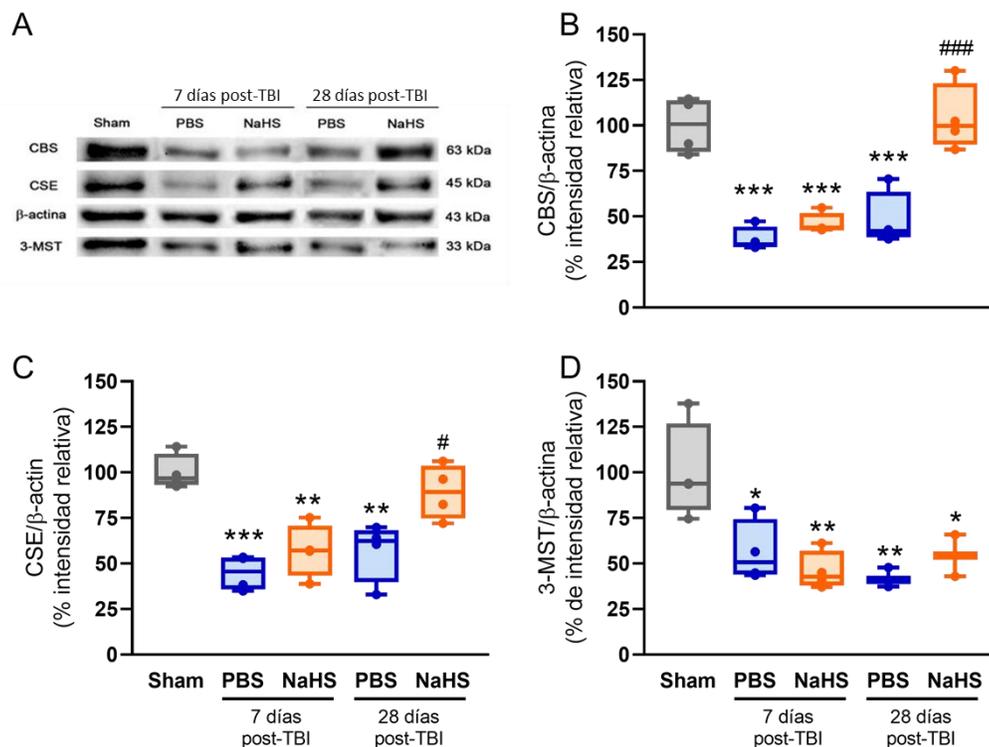
Cada valor representa el promedio de 6 animales  $\pm$  eem. PBS, buffer de fosfatos (vehículo del NaHS). La presión se muestra en atmósferas y el *neuroscore* en puntos. NS, *neuroscore* 2 días post-TCE; TCE, traumatismo craneoencefálico.

### 7.2.1. Expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el tallo y el hipotálamo

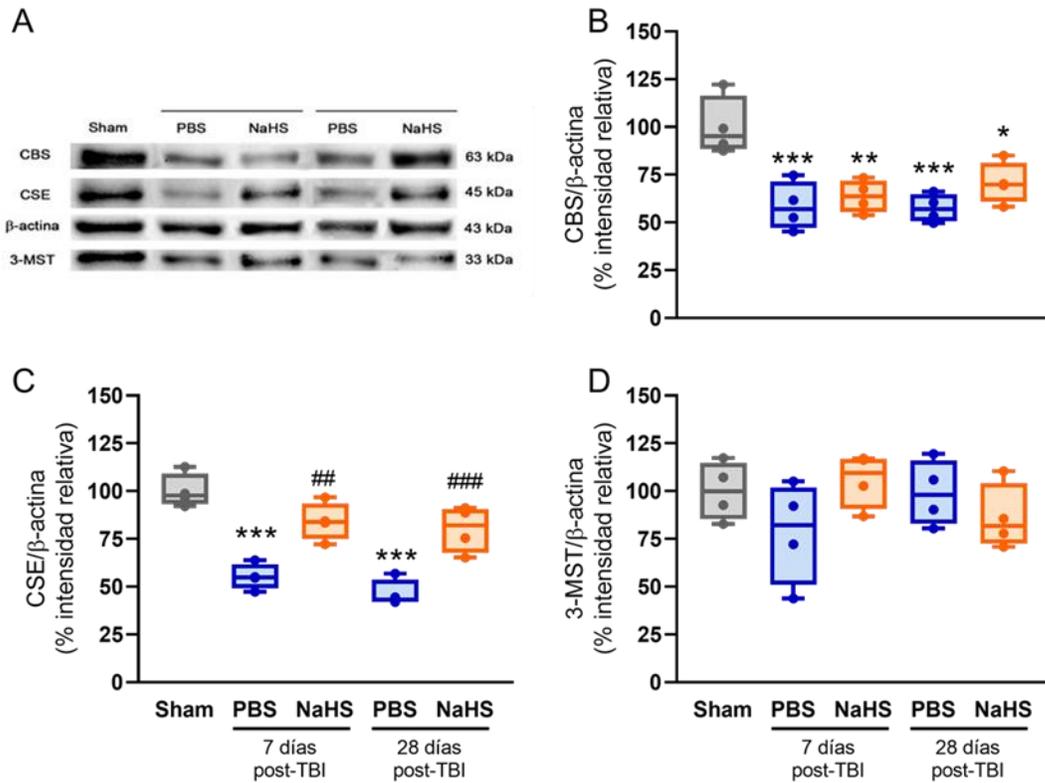
En la Figura 34 se muestra la imagen representativa (Figura 34A) del efecto de la administración subcrónica con NaHS (3.1 mg/kg) sobre los cambios de la expresión proteica de las enzimas CBS (Figura 34B), CSE (Figura 34C) y 3-MST (Figura 34D). El tratamiento subcrónico con NaHS restauró la expresión proteica de las enzimas CBS y la CSE en el hipotálamo a los 28 días (CBS, 56%,  $p=0.0002$ ; CSE, 33%,  $p=0.0273$ ; Figura 34B), pero no a los 7 días (CBS, 10%,  $p=0.8876$ ; CSE, 13%,  $p=0.7095$ ; Figura 34C) post-TCE severo respecto al grupo que recibió vehículo (Figuras 34B y C); mientras que, no indujo ningún efecto en los cambios observados post-TCE severo en la expresión de la enzima 3-MST (día 7, -9%,  $p=0.9028$ ; día 28, 12%,  $p=0.8929$ ; Figura 34D).

La Figura 35A muestra la imagen representativa del efecto de la administración subcrónica con NaHS (3.1 mg/kg) sobre los cambios de la expresión proteica de las enzimas CBS, CSE y 3-MST en el tallo cerebral. Así, la expresión de la enzima CBS permaneció sin cambios al día 7 (5%,  $p=0.9666$ ) y 28 (13%,  $p=0.4930$ ) post-TCE severo en los grupos tratados con NaHS cuando se compararon contra el grupo que recibió PBS (Figura 35B). Por otra parte, la administración subcrónica con NaHS fue capaz de revertir la disminución inducida por el TCE severo sobre la expresión proteica de la enzima CSE,

tanto al día 7 (31%,  $p=0.9666$ ) como al día 28 (38%,  $p=0.9666$ ) post-TCE (Figura 35C). Similar a lo observado en el hipotálamo, la administración subcrónica de NaHS no modificó de manera significativa la expresión de la enzima 3-MST (día 7, 20%,  $p=0.2800$ ; día 28, -13%,  $p=0.8620$ ; Figura 35D).



**Figura 34. Efecto del tratamiento subcrónico con NaHS en los cambios de la expresión proteica post-TCE severo en el hipotálamo.** Imagen representativa (A), CBS (B), CSE (C), 3-MST (D). Cada caja representa la media y los cuartiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95 de 4 animales. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. Sham. #,  $p < 0.05$ ; ###,  $p < 0.001$  vs. PBS.

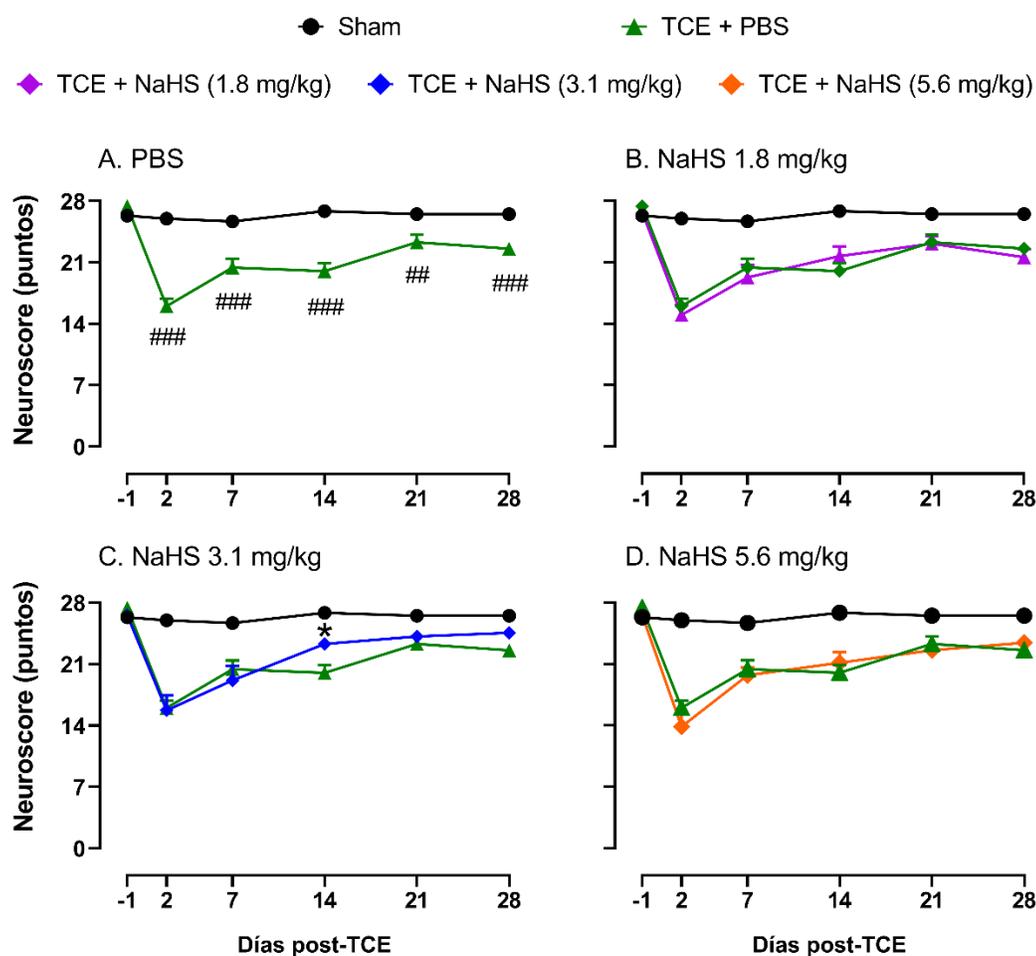


**Figura 35. Efecto del tratamiento subcrónico con NaHS en los cambios de la expresión proteica post-TCE severo en el tallo cerebral.** Imagen representativa (A), CBS (B), CSE (C), 3-MST (D). Cada caja representa la media y los cuartiles 25 y 75 y los bigotes los percentiles 5 y 95 de 4 animales. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. *Sham*. ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  vs. PBS.

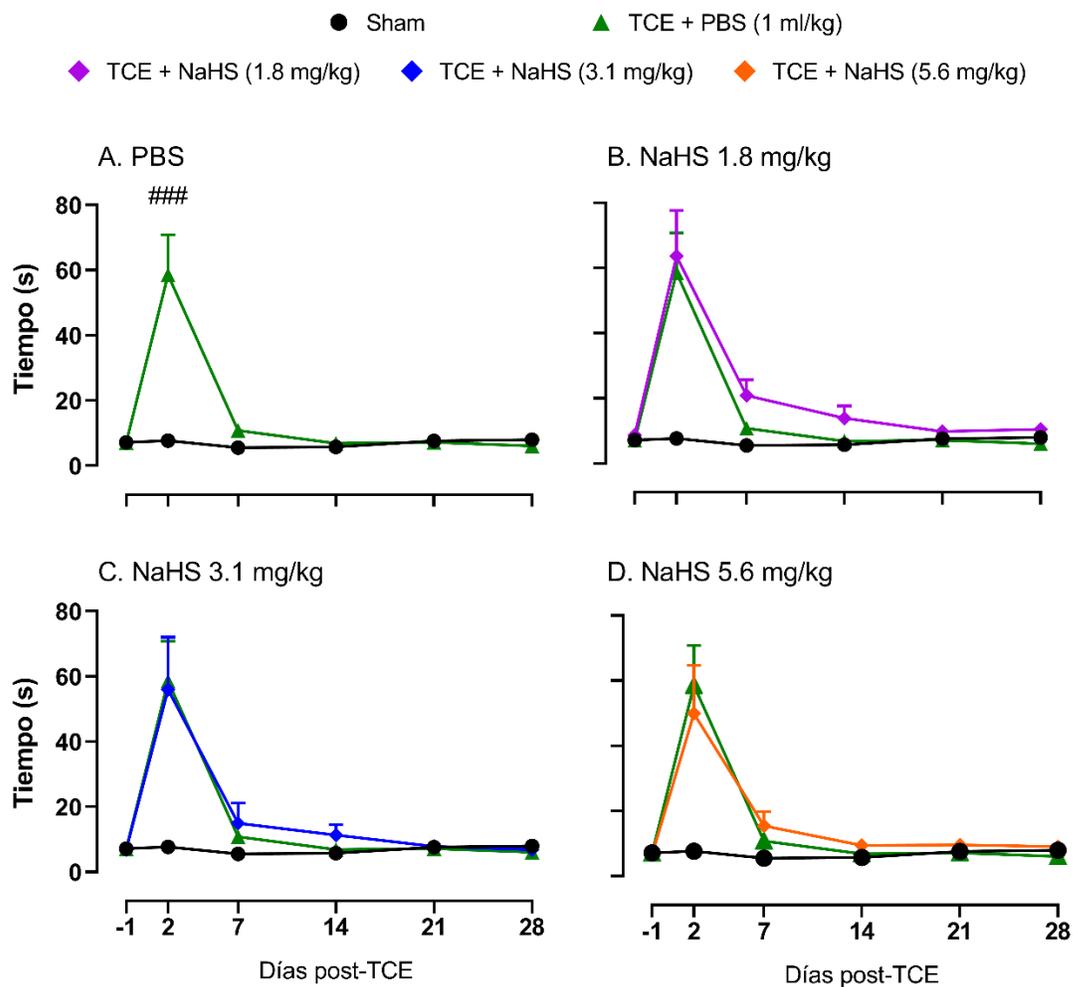
### 7.2.2. Función sensoriomotora

La administración de PBS (vehículo del NaHS; 1 ml/kg) no tuvo ningún efecto sobre la disfunción sensoriomotora observada post-TCE severo ( $F_{(1,5)} = 12.757$ ;  $p < 0.001$  vs grupo *sham*; Figura 36A). En cuanto a la barra transversa, se observó un incremento del tiempo al día 2 post-TCE severo ( $F_{(1,5)} = 10.618$ ;  $p < 0.001$  vs grupo *sham*; Figura 36A) y una disminución de la puntuación al día 2, 7 y 14 post-TCE severo ( $F_{(1,5)} = 13.874$ ;  $p < 0.001$  vs grupo *sham*; Figura 37A) tras la administración del vehículo, resultados que concuerdan con los obtenidos en el grupo que no recibió la administración del vehículo. Además, la administración subcrónica de NaHS (1.8, 3.1 y 5.6 mg/kg) no tuvo ningún significativo efecto benéfico sobre la función sensoriomotora o coordinación

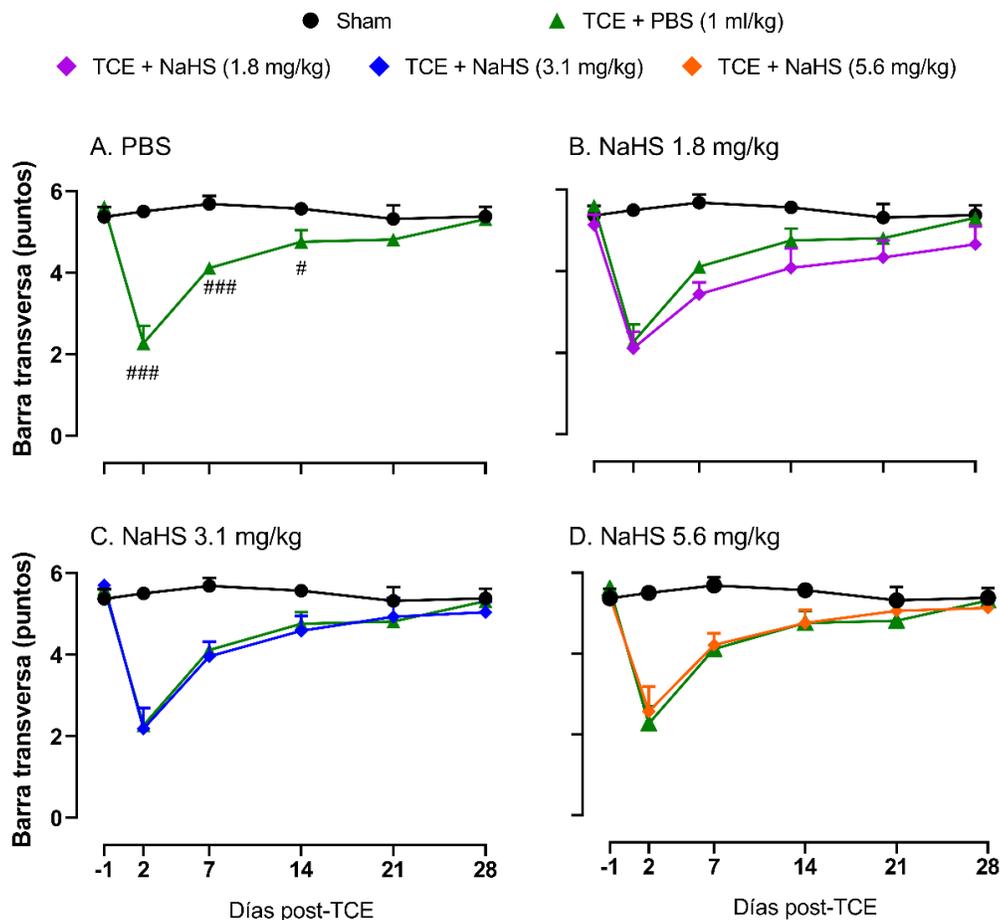
motora ya que el puntaje del *neuroscore* (1.8 mg/kg,  $F_{(1,5)} = 0.860$ ;  $p = 0.512$ ; 3.1 m/kg,  $F_{(1,5)} = 1.971$ ;  $p = 0.092$ ; 5.6 mg/kg,  $F_{(1,5)} = 1.524$ ;  $p = 0.191$ ; Figuras 36B, 36C y 36D), el tiempo en la barra (1.8 mg/kg,  $F_{(1,5)} = 0.226$ ;  $p = 0.950$ ; 3.1 m/kg,  $F_{(1,5)} = 0.0608$ ;  $p = 0.997$ ; 5.6 mg/kg,  $F_{(1,5)} = 0.406$ ;  $p = 0.843$ ; Figuras 37B, 37C y 37D) y el puntaje en la barra transversa (1.8 mg/kg,  $F_{(1,5)} = 0.0418$ ;  $p = 0.999$ ; 3.1 m/kg,  $F_{(1,5)} = 0.0818$ ;  $p = 0.995$ ; 5.6 mg/kg,  $F_{(1,5)} = 0.472$ ;  $p = 0.796$ ; Figuras 38B, 38C y 38D) no fueron modificados de manera significativa comparado con el grupo que recibió vehículo.



**Figura 36. Efecto del NaHS en la disfunción sensoriomotora inducida por el TCE severo (*neuroscore*).** (A) PBS (1 ml/kg); (B) NaHS 1.8 mg/kg; (C) NaHS 3.1 mg/kg; (D) NaHS 5.6 mg/kg. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. #,  $p < 0.05$ ; ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  vs *sham*; \*,  $p < 0.05$  vs PBS por ANOVA de dos vías con *post-hoc* de Tukey.



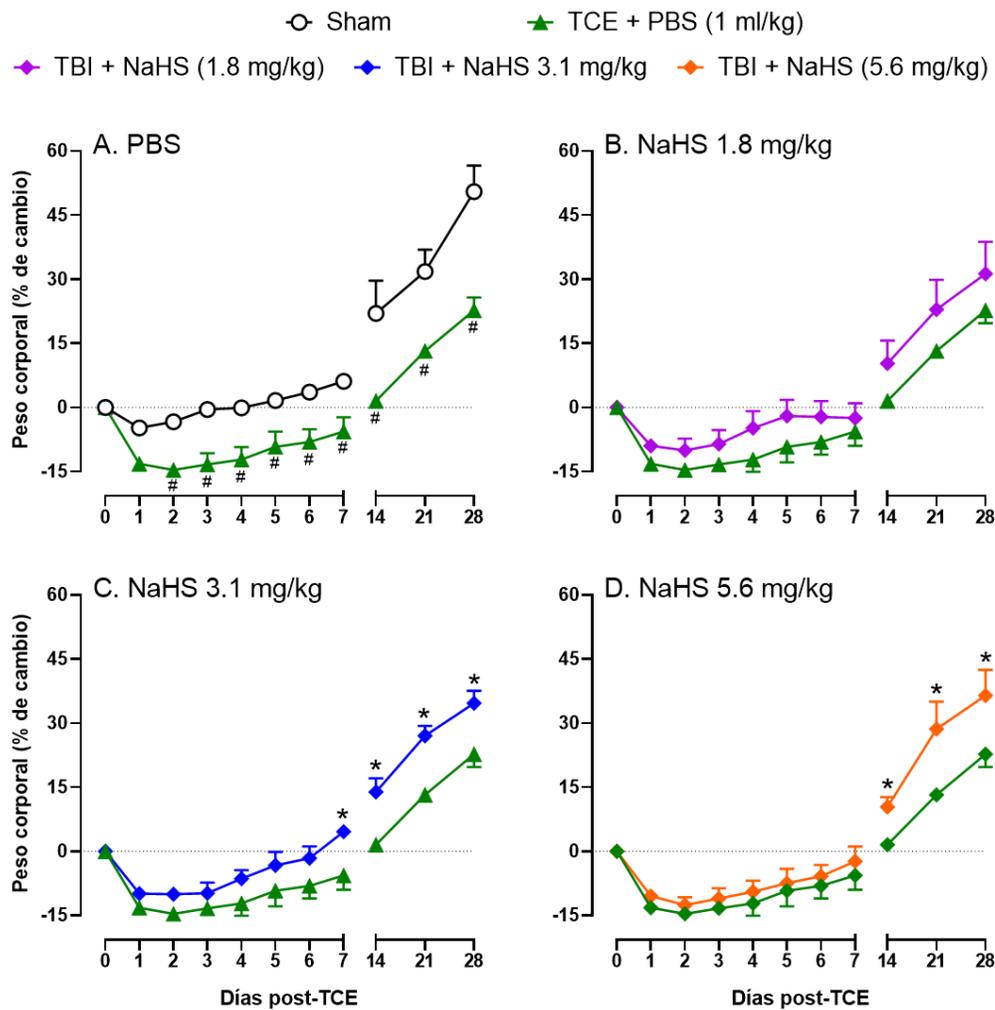
**Figura 37. Efecto del NaHS en la disfunción de la coordinación motora inducida por el TCE severo (tiempo en la barra transversa).** (A) PBS (1 ml/kg); (B) NaHS 1.8 mg/kg; (C) NaHS 3.1 mg/kg; (D) NaHS 5.6 mg/kg. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. #,  $p < 0.05$  vs sham por ANOVA de dos vías con *post-hoc* de Tukey.



**Figura 38. Efecto del NaHS en la disfunción de la coordinación motora inducida por el TCE severo (puntaje en la barra transversa).** (A) PBS (1 ml/kg); (B) NaHS 1.8 mg/kg; (C) NaHS 3.1 mg/kg; (D) NaHS 5.6 mg/kg. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. #,  $p < 0.05$ ; ###,  $p < 0.001$  vs sham por ANOVA de dos vías con *post-hoc* de Tukey.

La Figura 39 muestra el efecto del tratamiento subcrónico con NaHS sobre la pérdida de peso corporal inducida por el TCE severo. La ganancia de peso en los animales que recibieron el tratamiento con vehículo (PBS) fue significativamente más baja comparada con el grupo sham ( $F_{(1,9)} = 2.237$ ;  $p = 0.026$ ; Figura 39A). Asimismo, la administración de la dosis de 1.8 mg/kg de NaHS no revirtió los cambios en el peso corporal inducidos por el TCE severo ( $F_{(1,9)} = 0.177$ ;  $p = 0.996$ ; Figuras 39B). La administración de NaHS 3.1 mg/kg promovió una ganancia de peso de los animales sometidos a un TCE severo, particularmente al día 7 (9%;  $p = 0.004$ ), 14 (13%;  $p < 0.001$ ), 21 (14%;  $p < 0.001$ ) y 28 (12%;  $p = 0.001$ ; Figura 39C), mientras que la dosis de 5.6 mg/kg

incrementó la ganancia de peso a los días 14 (9%;  $p=0.048$ ), 21 (15%;  $p<0.001$ ) y 28 (14%;  $p=0.003$ ; Figura 39D), comparado con el grupo *sham*.

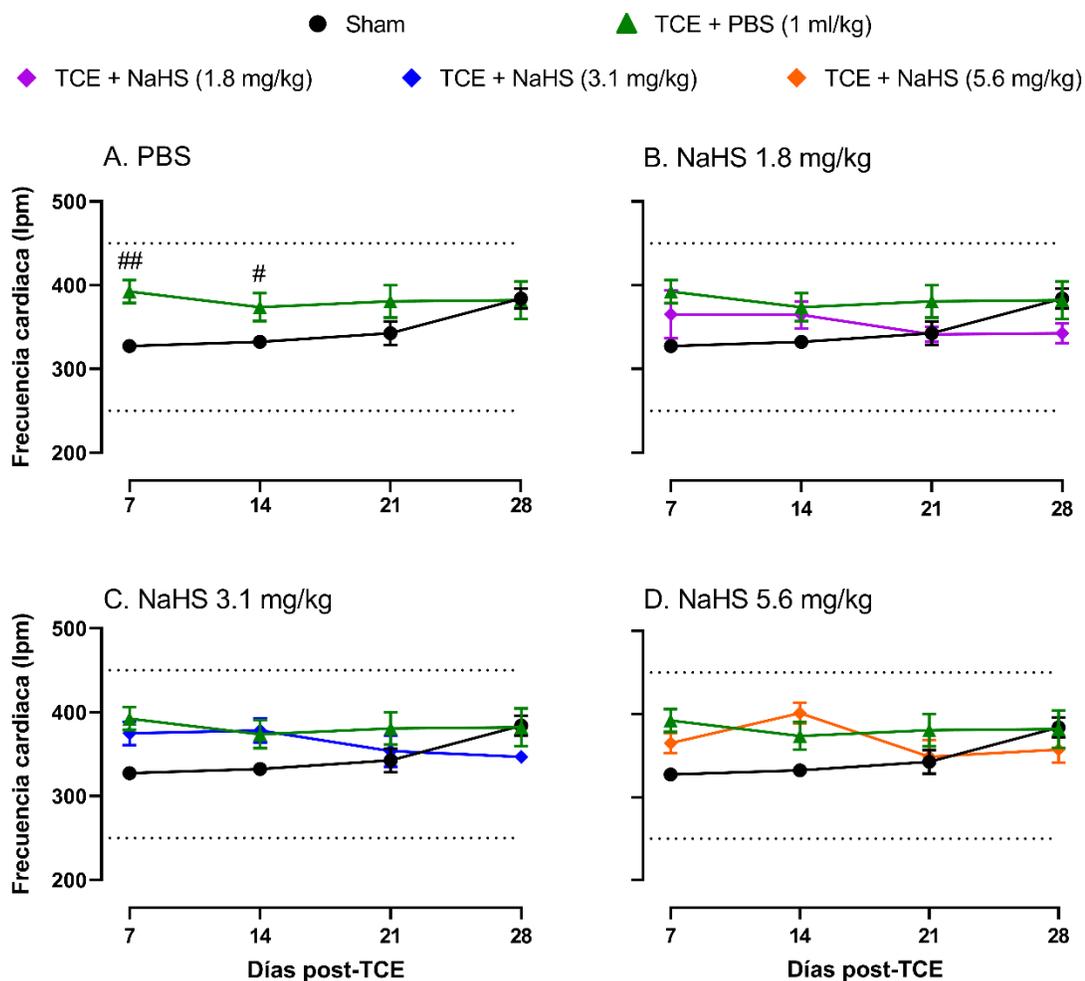


**Figura 39. Efecto del NaHS en la pérdida de peso corporal inducida por el TCE severo.** (A) PBS (1 ml/kg); (B) NaHS 1.8 mg/kg; (C) NaHS 3.1 mg/kg; (D) NaHS 5.6 mg/kg. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. #,  $p < 0.05$  vs *sham*; \*,  $p < 0.05$  vs PBS por ANOVA de dos vías con *post-hoc* de Tukey.

### 7.2.3. Variables hemodinámicas

El efecto de la administración subcrónica de NaHS sobre las alteraciones hemodinámicas inducidas por el TCE severo se puede observar en las Figuras 40-43. En los animales que recibieron el tratamiento con el vehículo (PBS) se observa un incremento significativo de la FC a los días 7 (20%;  $p=0.007$ ) y 14

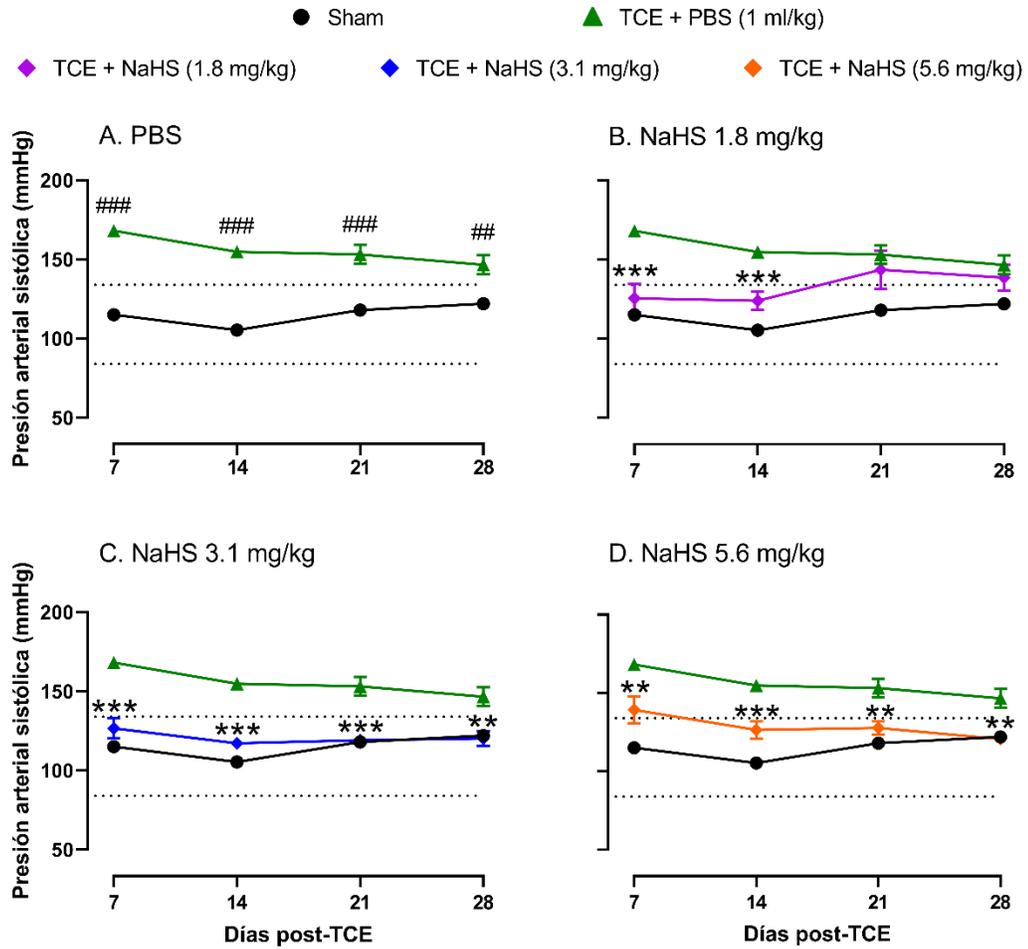
(16%,  $p=0.047$ ) después del TCE, sin cambios significativos al día 21 ( $p=0.148$ ) y 28 ( $p=0.836$ ) post-TCE. La administración de NaHS 1.8, 3.1 y 5.6 mg/kg (día 7,  $F_{(3,25)}=0.805$ ;  $p=0.503$ ; día 14,  $F_{(3,25)}=0.596$ ;  $p=0.624$ ; día 21,  $F_{(3,25)}=1.080$ ;  $p=0.375$ ; día 28,  $F_{(3,25)}=0.1870$ ;  $p=0.140$ ) no revirtió el incremento en la FC inducido por el TCE severo (Figuras 40A, 40B, 40C y 40D).



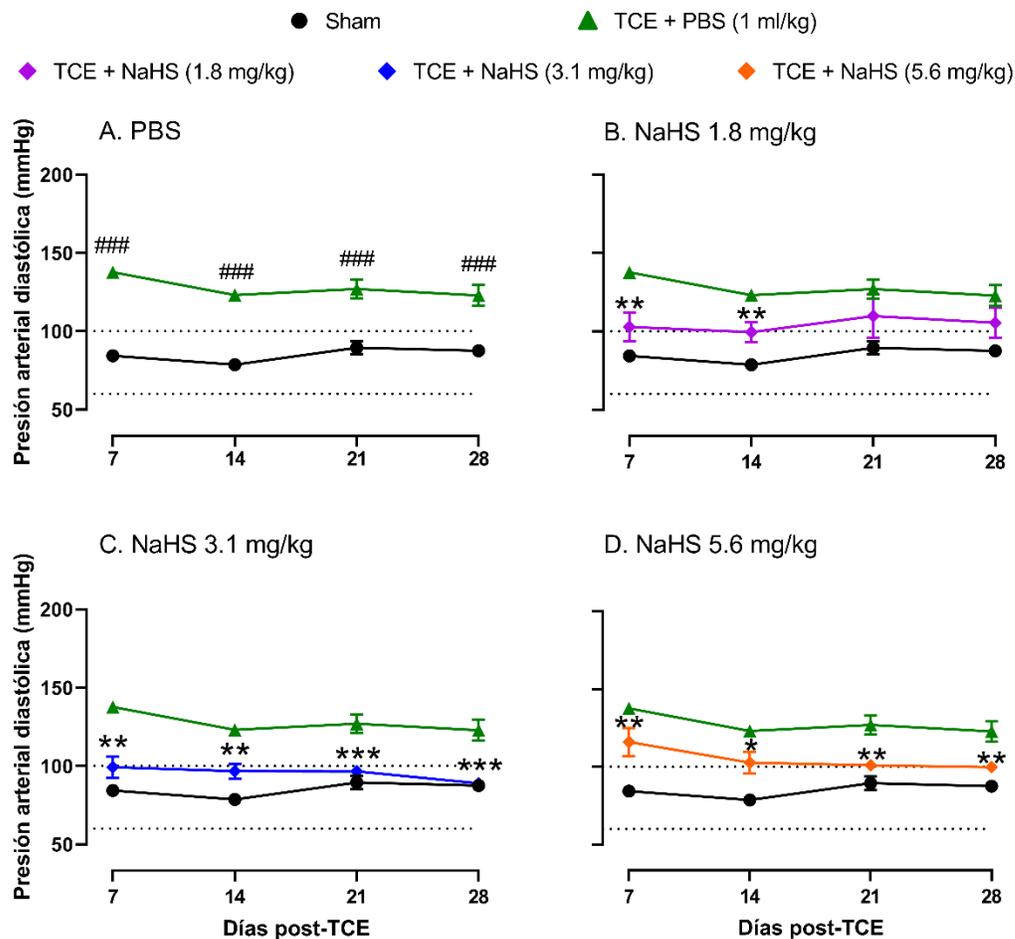
**Figura 40. Efecto del NaHS en los cambios en la frecuencia cardiaca post-TCE severo.** (A) PBS (1 ml/kg); (B) NaHS 1.8 mg/kg; (C) NaHS 3.1 mg/kg; (D) NaHS 5.6 mg/kg. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. Las líneas punteadas representan los valores fisiológicos. ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  vs sham por t-test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs PBS por One-Way ANOVA con *post-hoc* de Dunnet.

En cuanto a la presión arterial (Figuras 41, 42 y 43), se observó que tras la administración del vehículo la presión arterial se mantiene incrementada desde el día 7 y hasta el día 28 post-TCE severo (PAS, día 7, 46%,  $p < 0.001$ ; día 14, 47%,  $p < 0.001$ ; día 21, 30%,  $p < 0.001$ ; día 28, 20%,  $p = 0.004$ ; PAD, día 7, 63%,  $p < 0.001$ ; día 14, 56%,  $p < 0.001$ ; día 21, 42%,  $p < 0.001$ ; día 28, 40%,  $p = 0.004$ ; PAM, día 7, 46%,  $p < 0.001$ ; día 14, 52%,  $p < 0.001$ ; día 21, 36%,  $p < 0.001$ ; día 28, 31%,  $p = 0.004$ ; Figuras 41A, 42A y 43A). En marcado contraste, la administración de NaHS a 1.8 mg/kg disminuyó la presión arterial sistólica y diastólica de manera transitoria, únicamente a los días 7 (PAS, 69%  $p < 0.001$ ; PAD, 31%,  $p = 0.004$ ) y 14 (PAS, 38%,  $p < 0.001$ ; PAD, 43%  $p < 0.001$ ) post-TCE severo (Figuras 41B y 42B); mientras que, la presión arterial media únicamente se restableció al día 14 (38%  $p < 0.001$ ) post-TCE severo en el grupo tratado con 1.8 mg/kg de NaHS (Figura 43B).

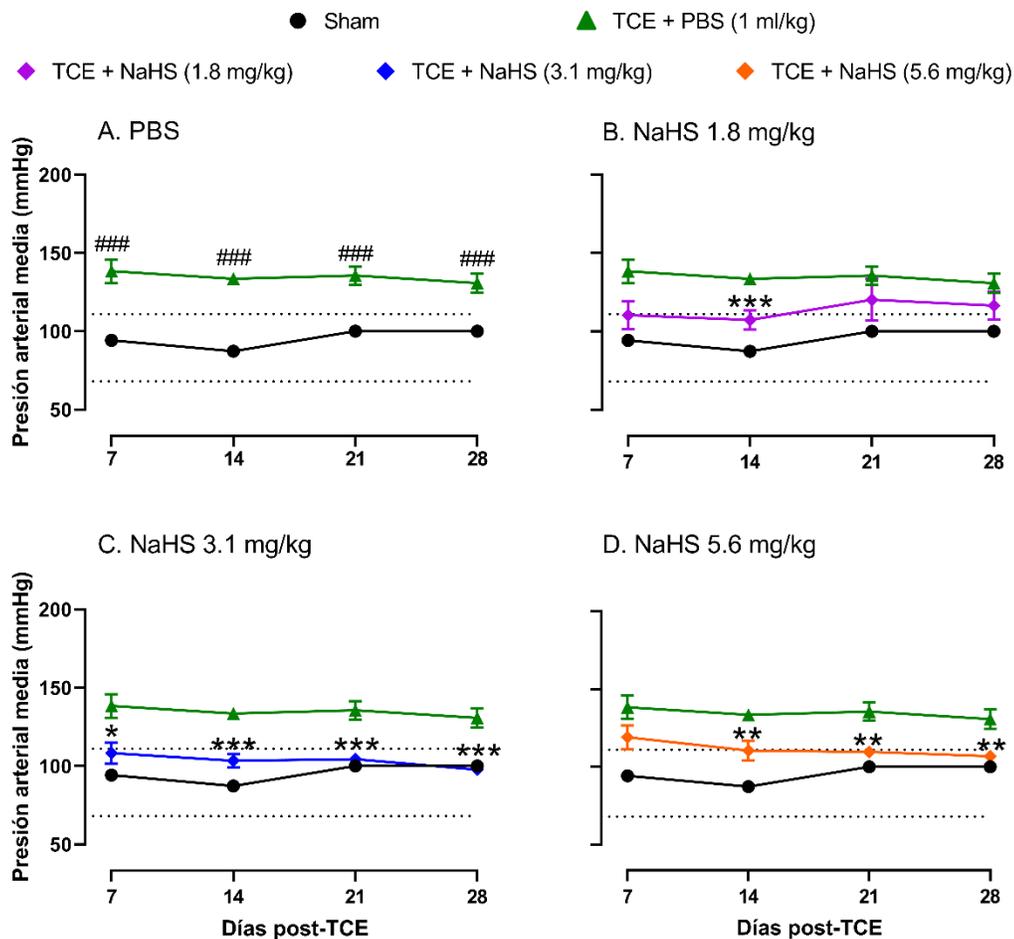
La administración de 3.1 mg/kg de NaHS previno las alteraciones en la presión arterial sistólica (día 7,  $p = 0.542$ ; día 14,  $p = 0.224$ ; día 21,  $p = 0.998$ ; día 28,  $p = 0.991$ ), diastólica (día 7,  $p = 0.362$ ; día 21,  $p = 0.672$ ; día 28,  $p = 0.996$ ) y media (día 7,  $p = 0.467$ ; día 14,  $p = 0.056$ ; día 21,  $p = 0.888$ ; día 28,  $p = 0.984$ ), ya que se observaron valores similares a los obtenidos en el grupo sham, excepto para la PAD al día 14 ( $p = 0.044$ ) (Figuras 41C, 42C y 43C). En cuanto a la dosis de 5.6 mg/kg de NaHS, esta dosis previno las alteraciones en la presión arterial sistólica desde el día 7 y hasta el día 28 (día 7, 17%,  $p = 0.010$ ; día 14, 18%,  $p < 0.001$ ; día 21, 17%,  $p = 0.002$ ; día 28, 18%,  $p = 0.002$ ) después del TCE severo (Figura 41D); mientras que la presión arterial diastólica y la presión arterial media se restauran al día 14 (PAD, 17%,  $p = 0.015$ ; PAM, 17%,  $p = 0.03$ ), día 21 (PAD, 20%,  $p = 0.001$ ; PAM, 19%,  $p = 0.001$ ), y día 28 (PAD, 19%,  $p = 0.008$ ; PAM, 18%,  $p = 0.004$ ) pero no al día 7 (PAD,  $p = 0.083$ ; PAM,  $p = 0.183$ ) después del TCE severo comparado con el grupo que recibió vehículo (Figuras 42D y 43D).



**Figura 41. Efecto del NaHS en los cambios en la presión arterial sistólica post-TCE severo.** (A) PBS (1 ml/kg); (B) NaHS 1.8 mg/kg; (C) NaHS 3.1 mg/kg; (D) NaHS 5.6 mg/kg. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. Las líneas punteadas representan los valores fisiológicos. ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  vs sham por t-test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs PBS por One-Way ANOVA con *post-hoc* de Dunnet.



**Figura 42. Efecto del NaHS en los cambios en la presión arterial diastólica post-TCE severo.** (A) PBS (1 ml/kg); (B) NaHS 1.8 mg/kg; (C) NaHS 3.1 mg/kg; (D) NaHS 5.6 mg/kg. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. Las líneas punteadas representan los valores fisiológicos. ###,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  vs *sham* por t-test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs PBS por One-Way ANOVA con *post-hoc* de Dunnet.

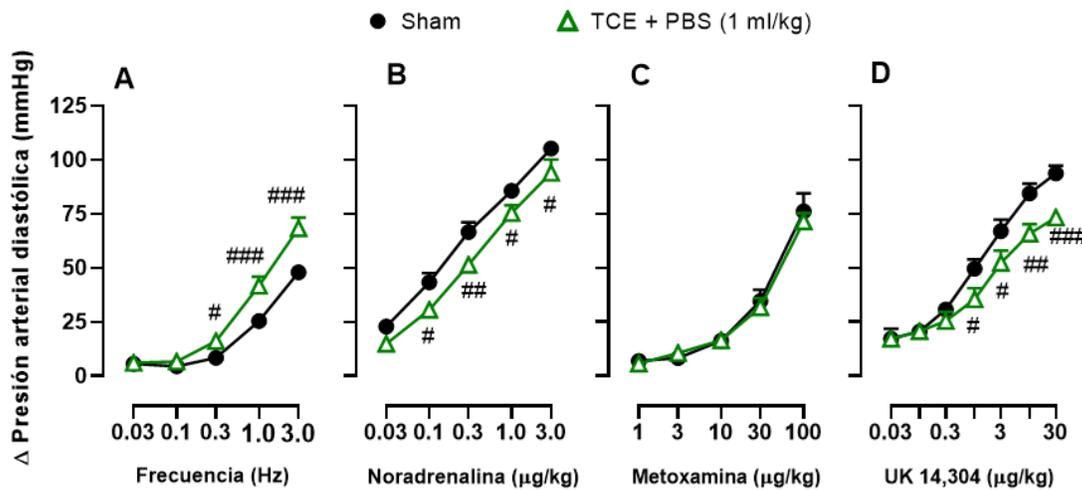


**Figura 43. Efecto del NaHS en los cambios en la presión arterial media post-TCE severo.** (A) PBS (1 ml/kg); (B) NaHS 1.8 mg/kg; (C) NaHS 3.1 mg/kg; (D) NaHS 5.6 mg/kg. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. Las líneas punteadas representan los valores fisiológicos. ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  vs sham por t-test. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs PBS por One-Way ANOVA con *post-hoc* de Dunnet.

#### 7.2.4. Actividad del tono simpático vasopresor

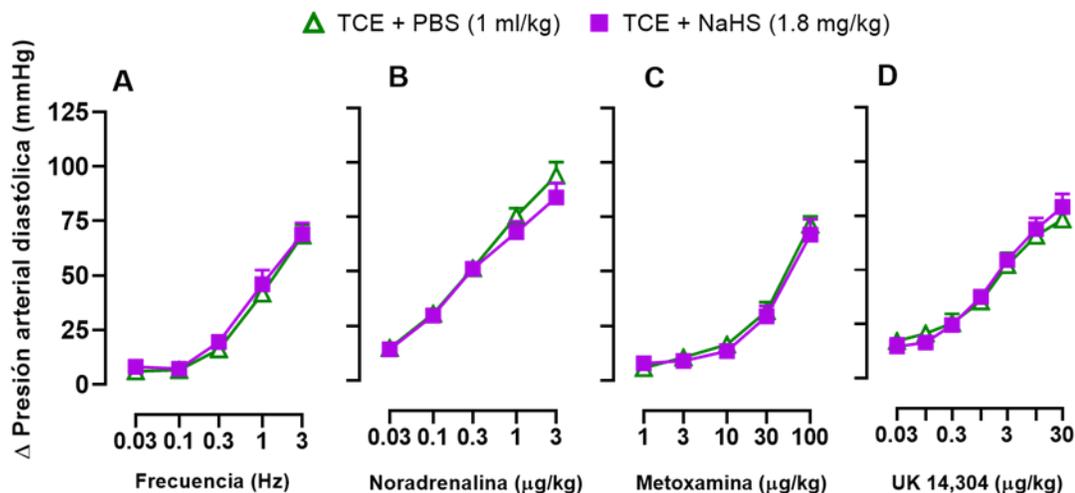
Una vez que se determinó que las alteraciones del sistema simpático se presentaban de manera concisa al día 28 post-TCE severo (ver Figura 32), se decidió evaluar el efecto de la administración subcrónica del NaHS a ese tiempo. En este contexto, después de la administración del PBS se sigue observando el incremento inducido por el TCE severo sobre la actividad simpática a las frecuencias de 0.3-3.0 Hz comparado con el grupo sham ( $F_{(1,4)}=36.786$ ;  $p < 0.001$ ; Figura 44A; 0.3Hz, 50%; 1.0 Hz, 95%; 3.0 Hz, 44%).

Además, las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina se mantuvieron disminuidas a las dosis de 0.1-3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $F_{(1,4)}=26.061$ ;  $p<0.001$ ; Figura 44B; 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 40%; 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 35%; 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 24%; 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 16%) sin cambios significativos en las respuestas inducidas por metoxamina ( $F_{(1,4)}=0.238$ ;  $p=0.916$ ; Figura 44C); mientras que, las respuestas inducidas por UK 14,304 disminuyeron de manera significativa a las dosis de 1.0-30.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $F_{(1,6)}=22.688$ ;  $p<0.001$ ; Figura 44D; 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 30%; 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 25%; 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 23%; 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 14%). Dado que encontramos que el grupo TCE + PBS presentaba las mismas alteraciones que el grupo que no recibió la administración de vehículo, se decidió utilizar el grupo TCE + PBS como grupo control para comparar el efecto de la administración subcrónica de NaHS.



**Figura 44. Efecto del PBS en las alteraciones simpáticas inducidas por el TCE severo.** Efecto del vehículo sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (A), noradrenalina (B), metoxamina (C) y UK 14,304 (D) 28 días post-TCE. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$  vs sham por ANOVA de dos vías de con prueba *post-hoc* de Tukey.

La administración subcrónica de NaHS a 1.8 mg/kg no previno las alteraciones inducidas por el TCE severo en las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica ( $F_{(1,4)}=0.108$ ;  $p=0.979$ ; Figura 45A), noradrenalina ( $F_{(1,4)}=0.686$ ;  $p=0.605$ ; Figura 45B), metoxamina ( $F_{(1,4)}=0.257$ ;  $p=0.904$ ; Figura 45C), o UK 14,304 ( $F_{(1,6)}=0.395$ ;  $p=0.880$ ; Figura 45D).

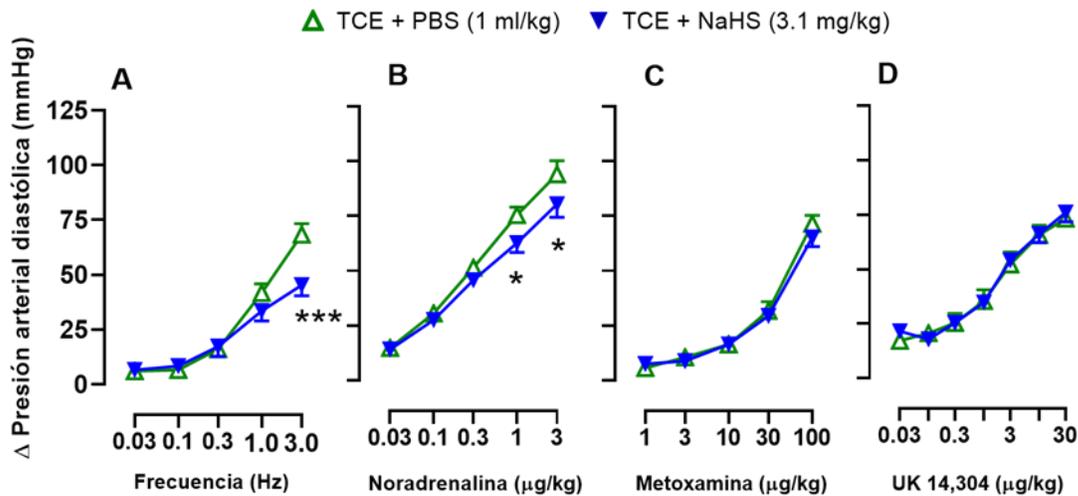


**Figura 45. Efecto de 1.8 mg/kg NaHS en las alteraciones simpáticas inducidas por el TCE severo.** Efecto de la dosis de 1.8 mg/kg sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (A), noradrenalina (B), metoxamina (C) y UK 14,304 (D) 28 días post-TCE. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales.

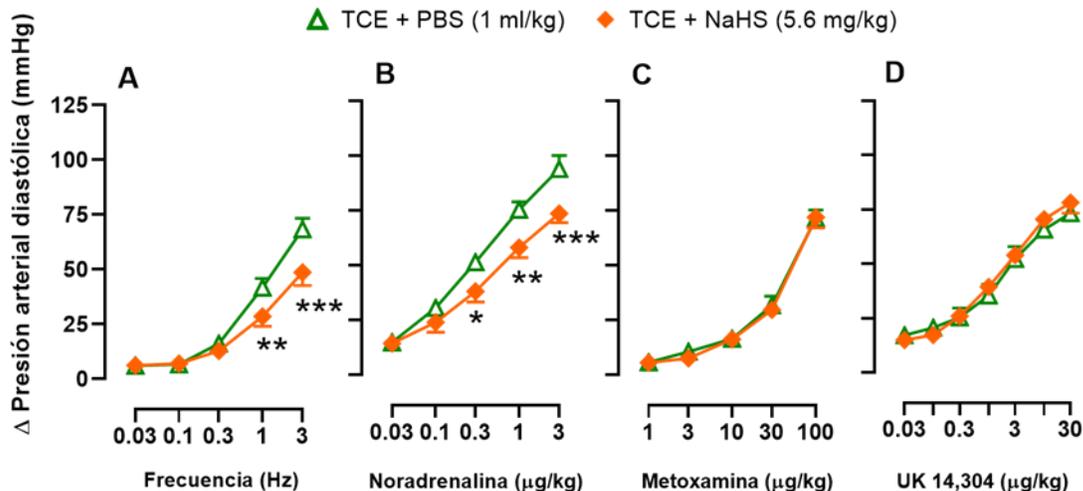
Por otra parte, la dosis de 3.1 mg/kg de NaHS disminuyó parcialmente las respuestas vasopresoras inducidas por la estimulación eléctrica, particularmente a la estimulación de 3Hz (34%;  $F_{(1,4)}=4.795$ ;  $p=0.002$ ). Por lo anterior, se puede sugerir que el NaHS a 3.1 mg/kg previno parcialmente la hiperactividad simpática observada post-TCE severo (Figura 46A). Además, la dosis de 3.1 mg/kg de NaHS disminuyó de manera significativa las respuestas vasopresoras inducidas por 1.0 y 3.0  $\mu\text{g/kg}$  de noradrenalina ( $F_{(1,4)}=9.492$ ;  $p=0.003$ ; Figura 46B; 1.0  $\mu\text{g/kg}$ , 17% y 3.0  $\mu\text{g/kg}$ , 15%). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en las respuestas vasopresoras inducidas por metoxamina ( $F_{(1,4)}=0.776$ ;  $p=0.546$ ; Figura 46C) o UK 14,304 ( $F_{(1,6)}=0.211$ ;  $p=0.972$ ; Figura 46D).

Por último, la dosis de 5.6 mg/kg de NaHS disminuyó las respuestas vasopresoras inducidas por 1.0 y 3.0 Hz de estimulación ( $F_{(1,4)}=3.434$ ;  $p=0.015$ ; Figura 47A; 1.0 Hz, 31% y 3.0 Hz, 30%), lo que sugiere que es capaz de prevenir la hiperactividad simpática inducida por el TCE severo. Adicionalmente, la dosis de 5.6 mg/kg de NaHS disminuyó las respuestas vasopresoras inducidas por la noradrenalina ( $F_{(1,4)}=22.171$ ;  $p<0.001$ ; Figura

47B; 0.3 µg/kg, 25%; 1.0 µg/kg, 23%; 3.0 µg/kg, 22%), sin cambios significativos en las respuestas derivadas de la administración de metoxamina ( $F_{(1,4)}=0.145$ ;  $p=0.965$ ; Figura 47C) o UK 14,304 ( $F_{(1,6)}=0.421$ ;  $p=0.863$ ; Figura 47D).



**Figura 46. Efecto de 3.1 mg/kg NaHS en las alteraciones simpáticas inducidas por el TCE severo.** Efecto de la dosis de 3.1 mg/kg sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (A), noradrenalina (B), metoxamina (C) y UK 14,304 (D) 28 días post-TCE. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs PBS por ANOVA de dos vías de con prueba *post-hoc* de Tukey.



**Figura 47. Efecto de 5.6 mg/kg NaHS en las alteraciones simpáticas inducidas por el TCE severo.** Efecto de la dosis de 5.6 mg/kg sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (A), noradrenalina (B), metoxamina (C) y UK 14,304 (D) 28 días post-TCE. Cada punto representa la media  $\pm$  EEM de 6 animales. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs PBS por ANOVA de dos vías de con prueba *post-hoc* de Tukey.

### 7.2.5 Resumen de resultados del experimento 2

Los resultados obtenidos en el experimento 2 demuestran que el tratamiento subcrónico con NaHS (3.1 mg/kg) restaura la expresión de la enzima CBS y CSE al día 28 post-TCE severo en el hipotálamo, y la expresión de la enzima CSE al día 7 y 28 post-TCE severo en el tallo cerebral (Figura 46). El tratamiento con NaHS no fue capaz de restaurar los cambios en la función sensoriomotora y coordinación motora y tuvo un efecto discreto sobre la ganancia de peso corporal en los animales sometidos a un TCE severo.

Además, el tratamiento subcrónico con NaHS previno el desarrollo de los cambios en la presión arterial que se presentan en los animales sometidos a un TCE severo, particularmente la dosis de 3.1 mg/kg (Figura 46).

Por último, el tratamiento subcrónico con NaHS a las dosis de 3.1 y 5.6 mg/kg previno la hiperactividad simpática observada después del TCE severo y disminuyó las respuestas vasopresoras inducidas por la noradrenalina (Figura 46).

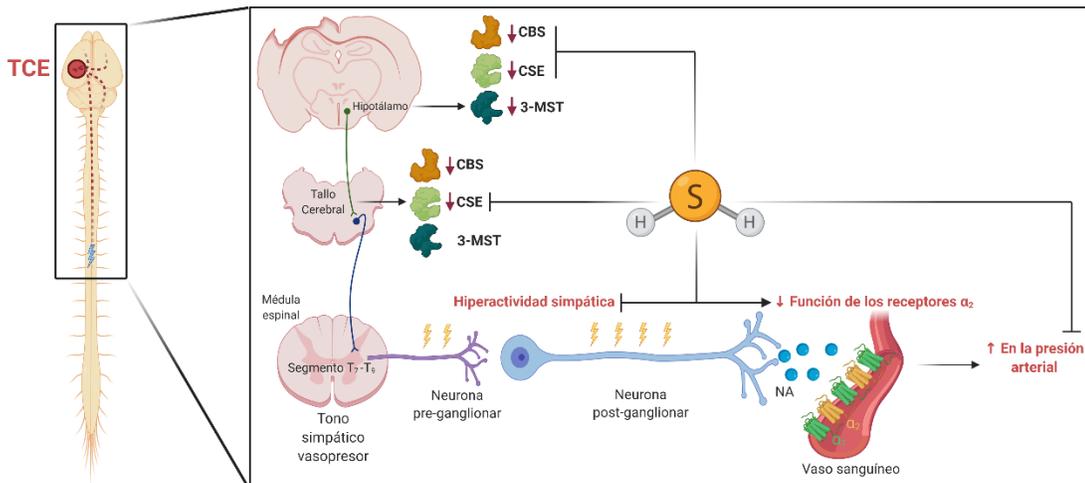


Figura 48. Resumen de resultados del experimento 2.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. General

El TCE es un proceso patológico complejo que involucra daño tanto a nivel central como periférico. Los efectos sistémicos del TCE son un grupo de alteraciones muy poco reconocidas dentro del área, a pesar de que influyen directamente el pronóstico de los pacientes (Lv et al., 2010). A pesar del impacto de las alteraciones post-TCE en la recuperación de los pacientes, las aproximaciones farmacológicas para estas consecuencias del TCE han sido poco estudiadas. A la fecha, se han hecho avances significativos en el entendimiento de los procesos que subyacen al TCE; sin embargo, no existen tratamientos adecuados que puedan prevenir la progresión de la lesión post-TCE. En este contexto, y como se ha mencionado previamente, el H<sub>2</sub>S induce efectos importantes en el sistema cardiovascular (Kimura, 2012). Además, el H<sub>2</sub>S representa un potencial agente terapéutico en las enfermedades cerebrales, incluido el TCE (Che et al., 2018; Zhang et al., 2017).

El presente estudio demuestra por primera vez que el TCE severo disminuye la expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el hipotálamo y el tallo cerebral. Además, se encontró que el TCE severo induce alteraciones hemodinámicas y simpáticas hasta, por lo menos, 28 días después de la inducción del trauma. Respecto a la expresión de las enzimas CBS, CSE y 3-MST, la administración subcrónica con NaHS restaura la expresión de manera dependiente del tiempo y del tejido evaluado. Por otra parte, el NaHS previno los cambios hemodinámicos y la hiperactividad simpática observados después del TCE severo. Sin embargo, el NaHS no generó ningún efecto benéfico en la disfunción sensoriomotora o las alteraciones en los receptores adrenérgicos inducidas por el TCE severo.

---

---

## 8.2. Alteraciones en la expresión proteica de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S

Como se mencionó en secciones previas, el sistema cardiovascular se regula por diversos factores que incluyen al sistema nervioso autónomo y estructuras a nivel central como el hipotálamo y el tallo cerebral. Por lo anterior, en el presente trabajo se exploró el efecto del TCE severo sobre las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en las estructuras cerebrales previamente mencionadas.

En este trabajo se encontró que tanto la enzima CBS como las enzimas CSE y 3-MST se encuentran expresadas en el tejido obtenido del grupo *sham*. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos que han reportado la presencia de mRNA (Moustafa, 2021) y expresión proteica de las enzimas CBS, CSE y 3-MST en el hipotálamo (Coletti et al., 2019; Nogueira et al., 2017) y el tallo cerebral (Duan et al., 2015a; Fouda et al., 2018; Li et al., 2013) obtenidos de animales control.

Por otra parte, la expresión de la CBS y la 3-MST se encuentra alterada en la corteza y el hipocampo de animales que fueron sometidos a un TCE moderado (Zhang et al., 2013, 2016). De manera interesante, los resultados del presente estudio muestran, por primera vez, que el TCE severo induce una disminución de: (1) las enzimas CBS, CSE y 3-MST en el hipotálamo, y (2) las enzimas CBS y CSE en el tallo cerebral. Notablemente, dichos cambios ocurren a diferentes días post-TCE severo para cada una de las enzimas (Figuras 11 y 12). Además, los cambios observados en esta investigación difieren en temporalidad con lo previamente reportado para la corteza y el hipocampo (Zhang et al., 2013, 2016), lo que nos permite sugerir que los cambios en la expresión proteica de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S dependen también del tejido evaluado.

El papel de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S, y por tanto la función del H<sub>2</sub>S, dentro del hipotálamo y el tallo cerebral siguen siendo controversiales. Sin embargo, está demostrado que la inhibición de la enzima CBS con ácido amino-oxiacético o hidroxilamina, en el hipotálamo posterior de ratas

normotensas, incrementa la presión arterial media y frecuencia cardiaca (Dawe et al., 2008). La misma aproximación experimental en la RVLM de ratas normotensas incrementa la actividad nerviosa simpática en conjunto con el incremento en las variables hemodinámicas (Duan et al., 2015). Además, en animales hipertensos, la inhibición de la actividad de la enzima CBS en la RVLM con hidroxilamina produce un incremento en la presión arterial media (Yu et al., 2015); mientras que, en el hipocampo, la administración del inhibidor de la enzima CBS (hidroxilamina) induce un incremento no solo en la presión arterial media y la frecuencia cardiaca, sino también en los niveles plasmáticos de noradrenalina (Liang et al., 2017). Por lo contrario, la administración de NaHS en el hipotálamo posterior disminuye la presión arterial media y frecuencia cardiaca (Dawe et al., 2008), así como la actividad nerviosa simpática cuando se administra en la RVLM (Guo et al., 2011). Respecto a la enzima CSE, la restauración de la actividad de esta enzima en la RVLM media la simpato-inhibición inducida por moxonidina (Fouda et al., 2018). Por lo tanto, los resultados sugieren que las alteraciones en las variables hemodinámicas observadas después de un TCE severo pudieran estar mediadas, en parte, por los cambios en la expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el hipotálamo y el tallo cerebral.

Como muchas otras proteínas, la expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S está altamente regulada por mecanismos transcripcionales (Guo et al., 2014; Hassan et al., 2012; Yang et al., 2011) y diversas modificaciones post-transcripcionales que incluyen la fosforilación (D'Emmanuele di Villa Bianca et al., 2016; Renga et al., 2015), sumoilación (Agrawal & Banerjee, 2008), e incluso la persulfuración (Mustafa et al., 2009). Como el H<sub>2</sub>S induce persulfuración de diversas proteínas y pudiera regular su síntesis por sí mismo, en el presente trabajo se decidió evaluar el efecto de la administración subcrónica de NaHS sobre las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el hipotálamo y el tallo cerebral a los 7 y 28 días post-TCE severo. Dichos tiempos fueron elegidos ya que para esos días de evaluación se observaron cambios en las enzimas en ambos tejidos cerebrales. De manera interesante, los resultados

muestran que la administración exógena de H<sub>2</sub>S restauró la expresión de las enzimas CBS y CSE en el hipotálamo al día 28 pero no al día 7 después del TCE severo, lo que sugiere un efecto del NaHS a largo plazo. Además, los datos muestran que la expresión de la enzima CSE se restauró en el tallo cerebral tanto al día 7 como al día 28 post-TCE severo. Por último, el tratamiento con NaHS no modifica de manera significativa la expresión de la enzima 3-MST en el hipotálamo o en el tallo cerebral de ratas sometidas a un TCE severo. Estos datos sugieren que el efecto del NaHS sobre las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S difiere en temporalidad y tejido evaluado. Acorde con los resultados generados en este trabajo, recientemente ha sido demostrado que la administración de NaHS induce la expresión de: (1) la enzima CBS en un modelo de hemorragia intracerebral (Shan et al., 2019) y diabetes mellitus (Roa-Coria et al., 2019); y (2) la enzima CSE en ratas diabéticas (Fouda et al., 2018). Por otra parte, los efectos del H<sub>2</sub>S exógeno sobre la expresión de la enzima 3-MST aún son controversiales, ya que algunos estudios muestran que la administración de donadores de H<sub>2</sub>S inducen una disminución de la expresión del mRNA de esta enzima en el hipotálamo (Coletti et al., 2019); mientras que, otros autores sugieren que los donadores de H<sub>2</sub>S no modifican la expresión de mRNA de la 3-MST en fibroblastos (Hourihan et al., 2013) o de la proteína en el cuerpo estriado en un modelo de hemorragia intracerebral (Shan et al., 2019).

A la fecha, los mecanismos que subyacen el incremento en la expresión de las enzimas CBS y CSE después de la administración de H<sub>2</sub>S exógeno han sido poco explorados. Sin embargo, como se mencionó previamente, la expresión de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S se regula por factores transcripcionales, tales como el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) (Hassan et al., 2012). Al mismo tiempo, ha sido reportado que el H<sub>2</sub>S regula la actividad de Nrf2 a través de la persulfuración de la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1) para promover la expresión de enzimas antioxidantes y disminuir el estrés oxidante (Corsello et al., 2018). Por lo tanto, es posible que el H<sub>2</sub>S exógeno genere la persulfuración de Keap1 e induzca la disociación de Nrf2 y,

subsecuentemente, se promueva la translocación de Nrf2 al núcleo para iniciar la expresión de las enzimas CBS y CSE, tal y como se ha sugerido previamente en experimentos *in vitro* en los que Nrf2 puede regular la expresión del mRNA de las enzimas CBS y CSE (Hourihan et al., 2013). Además, estudios previos han demostrado que el H<sub>2</sub>S induce neuroprotección contra el daño celular por modulación de la vía PI3K/Akt/Nrf2 (Zhang et al., 2019), sugiriendo un papel clave del Nrf2 y H<sub>2</sub>S durante el TCE. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para elucidar el mecanismo preciso por el cual el H<sub>2</sub>S exógeno modula la expresión de las enzimas CBS y CSE.

A la fecha, el presente estudio es el primero que: (1) mide los cambios en la expresión proteica de la enzima CSE en tejido cerebral después de un TCE severo, (2) demuestra alteraciones en las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en tejido de hipotálamo y tallo cerebral después de un TCE severo, y (3) evalúa el efecto del H<sub>2</sub>S exógeno sobre las enzimas CBS, CSE y 3-MST en tejido cerebral de animales sometidos a un TCE severo. Sin embargo, se debe admitir que la aproximación metodológica diseñada para este proyecto no permite la identificación de tipos celulares específicos en términos de los cambios observados en las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S. Por lo tanto, se requieren más estudios para determinar el efecto del TCE en la expresión de las enzimas CBS, CSE y 3-MST en diferentes tipos celulares del tejido cerebral.

### **8.3. Disfunción sensoriomotora y alteraciones en la ganancia de peso**

El TCE ha sido estudiado de manera preclínica usando una gran variedad de modelos animales, como el modelo de percusión lateral por fluidos (LFPI, por sus siglas en inglés). El modelo de LFPI permite inducir TCE de distinta severidad, que van desde leve (0.1-1.0 atm) hasta moderado (1.5-2.0 atm), o severo (2.6-3.6 atm) (McIntosh et al., 1987). En este sentido, se ha demostrado que algunos eventos post-TCE, tales como la liberación de glutamato (Faden et al., 1989), la neurogénesis (Wang et al., 2016) y las alteraciones a largo plazo de la memoria espacial y el aprendizaje (An et al., 2016), dependen de

la severidad del trauma. Es importante mencionar que, de acuerdo a la presión del pulso en el modelo de TCE, los animales utilizados en este proyecto fueron clasificados como severos en todos los grupos experimentales (Tablas 5-9). Además, el TCE también se puede clasificar con base en la función sensoriomotora de los animales (16-20 puntos para moderado y  $\leq 15$  puntos para severo). Por lo tanto, los animales de algunos grupos experimentales utilizados en este proyecto pudieran considerarse como severo o moderado (McIntosh et al., 1989). La falta de correlación entre la presión del impacto ha sido recientemente demostrada en un estudio multicéntrico, en el cuál dos de los tres centros involucrados describieron que la severidad basada en atmósferas no es la misma que la severidad basada en las pruebas conductuales (Ndode-Ekane et al., 2019). Dicha falta de correlación entre la presión del impacto y la función sensoriomotora puede explicarse por variabilidad interindividual (O'Bryant et al., 2011).

La función sensoriomotora y la coordinación motora están reguladas en distintas áreas cerebrales, tales como la corteza somatosensorial, la corteza motora, los ganglios basales, el tálamo, el tallo cerebral y el cerebelo (Bostan & Strick, 2018; Soblosky et al., 1996). En este contexto, se ha demostrado que el TCE induce daño que en las vías somatosensoriales ascendentes y las vías motoras descendientes promoviendo alteraciones en la función sensoriomotora (Bhowmick et al., 2018; Johnstone et al., 2015). Dichas alteraciones permanecen, por lo menos, 6 meses después del TCE (Sell et al., 2017). Además, el TCE induce daño en la coordinación motora que se revierten antes de 1 mes de evaluación después de trauma (Sell et al., 2017). En congruencia con lo anterior, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la función sensoriomotora permanece afectada durante los 28 días de evaluación; mientras que, la coordinación motora se recupera al día 14 post-TCE severo.

Dado que el presente proyecto tenía como objetivo principal evaluar los cambios hemodinámicos, los animales fueron divididos en TCE moderado y

TCE severo para excluir una potencial influencia de la severidad del TCE sobre las variables hemodinámicas. Los resultados demuestran que, bajo nuestras condiciones experimentales, los cambios observados sobre las variables hemodinámicas fueron independientes de la severidad (Figura 14); por lo que, para propósitos de este estudio, ambas severidades fueron consideradas como un solo grupo experimental. Acorde con esto, el TCE moderado y severo ha sido considerados como un solo grupo en algunos estudios clínicos (Krishnamoorthy et al., 2017).

En nuestras condiciones experimentales, el tratamiento subcrónico con NaHS (1.8, 3.1 y 5.6 mg/kg) no revirtió la disfunción sensoriomotora observada post-TCE severo. En contraste, estudios previos han demostrado que el tratamiento agudo con NaHS o ATB-346 fue capaz de restaurar la función motora (Campolo et al., 2014; Jiang et al., 2013). En este sentido, la falta de efecto en nuestros resultados podría deberse a las diferencias en el esquema de administración del NaHS. Además, el ATB-346 es un donador de H<sub>2</sub>S derivado de naproxeno, lo que sugiere que tanto el incremento plasmático de H<sub>2</sub>S como la inhibición de la ciclooxigenasa son necesarios para lograr los efectos sobre la función sensoriomotora (Campolo et al., 2014).

Por otra parte, está demostrado que el estrés oxidante en el hipotálamo produce disfunción autonómica después del TCE (Tümer et al., 2013). En este sentido, se sabe que la ingesta de alimento, la saciedad y la ganancia de peso corporal se regulan a nivel del hipotálamo basomedial (Azevedo et al., 2022). El hipotálamo basomedial envía conexiones hacia el tallo cerebral y otros núcleos del hipotálamo que tienen proyecciones autonómicas hacia los distintos órganos en la periferia. Por lo tanto, es posible que las alteraciones en el peso corporal estén mediadas por el daño que se produce a nivel hipotalámico después de un TCE severo.

Es importante destacar que los animales sometidos a un TCE severo durante el desarrollo de este proyecto fueron alimentados con suplementos alimenticios por vía oral. Sin embargo, está reportado que existe una elevación

de la tasa metabólica de entre 32% y 200% en pacientes que sufrieron un TCE de moderado a severo, lo cual podría contribuir a la disminución en el peso corporal después de un TCE severo (Foley et al., 2009; Roe y Rothwell, 2009). Además, el estado de inflamación sistémica inducida por el TCE contribuye al desarrollo de los efectos gastrointestinales, mediados por las alteraciones en el sistema nervios entérico y la microbiota, lo cual contribuye a la disminución de la absorción de nutrientes (Hanscom et al., 2021).

Respecto a lo anterior, existen reportes que sugieren que el H<sub>2</sub>S regula la ingesta y la ganancia de peso. En este sentido, está demostrado que la administración de GYY 4137 (un donador orgánico de H<sub>2</sub>S) promueve la fosforilación de AMPK y, por tanto, un incremento en la liberación de péptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (Zhou et al., 2018). A nivel sistémico, el H<sub>2</sub>S derivado de la enzima CSE incrementa la actividad del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) por sulfhidración del residuo de cisteína C139, lo que promueve la captura de glucosa y el almacenamiento de lípidos en los adipocitos (Cai et al., 2016). Asimismo, el GYY 4137 induce adipogénesis e hipertrofia de los adipocitos, lo que contribuye al aumento de peso corporal; mientras que, la administrador de PAG (un inhibidor de la CSE) genera el efecto opuesto (Geng et al., 2013).

#### **8.4. Alteraciones hemodinámicas**

El TCE está relacionado con alteraciones cardiovasculares. De hecho, también está descrito que la hipertensión y los eventos adversos cardiovasculares y cerebrovasculares están altamente asociados con el TCE (Eric Nyam et al., 2019; Hammond et al., 2019). En este sentido, bajo nuestras condiciones experimentales, encontramos un incremento en las variables hemodinámicas. Consistente con nuestros resultados, ha sido reportado previamente que la presión arterial sistólica incrementa tanto a nivel clínico en pacientes con TCE (Hilz et al., 2017; Krishnamoorthy et al., 2017), como en estudios preclínicos en modelos experimentales de TCE (Chen et al., 2019; Larson et al., 2012).

En contraste con nuestros datos, está reportado una disminución de la presión arterial y la frecuencia cardiaca que se observa hasta 4 h post-TCE moderado (Umemoto et al., 2019). Sin embargo, es importante destacar que nuestros efectos sobre las variables hemodinámicas se presentaron a partir del día 7. En el caso de la frecuencia cardiaca, el incremento observado en esta variable se revirtió al día 14 post-TCE severo; mientras que, la presión arterial sistólica, diastólica y media se mantienen elevadas hasta el tiempo más largo de evaluación (28 días post-TCE severo).

Los datos generados en este proyecto muestran que el tratamiento subcrónico con NaHS no afectó el incremento inducido por el TCE severo en la frecuencia cardiaca. En este sentido, previamente en nuestro grupo de trabajo, ha sido reportado que la administración crónica de NaHS por 28 días a la dosis de 5.6 mg/kg revierte las alteraciones en la frecuencia cardiaca observadas en un modelo de obesidad inducido por dieta rica en grasas (Gomez et al., 2019). Sin embargo, es importante señalar que los mecanismos por los cuales se altera la frecuencia cardiaca durante la obesidad y el TCE severo pudieran no ser similares. De hecho, nuestros datos muestran una restauración *per se* de la frecuencia cardiaca a los 21 días post-TCE. Además, aunque la dosis de NaHS coincida, el esquema de administración fue diferente entre ambos estudios.

Notablemente, nuestros resultados demuestran que la administración subcrónica de NaHS restauró la presión arterial en animales sometidos al TCE severo particularmente con las dosis de 3.1 y 5.6 mg/kg. A pesar de que no se han realizado estudios para elucidar el efecto del H<sub>2</sub>S en las alteraciones cardiovasculares post-TCE, es bien sabido que la depleción de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S de manera endógena, particularmente la enzima CSE, induce un incremento en la presión arterial de ratones (Yang et al., 2008).

Además, la administración de donadores de H<sub>2</sub>S produce una disminución de la presión arterial en distintos modelos de hipertensión, como aquella inducida por dieta rica en grasas (Gomez et al., 2019), la hipertensión inducida por la

administración de L-NAME (Zhong et al., 2003), y en ratas Dahl sensibles a sodio (Huang et al., 2015). Respecto al TCE, se ha observado una disminución de los niveles plasmáticos de H<sub>2</sub>S posterior al TCE, lo que sugiere una desregulación de la vía del H<sub>2</sub>S durante esta patología (Zhang et al., 2013). Acorde con esta desregulación, nuestros datos demuestran que la administración de H<sub>2</sub>S exógeno contribuye a la restauración de las variables hemodinámicas observadas después del TCE severo.

Es importante mencionar que la administración de NaHS se realizó de manera intraperitoneal, y que el H<sub>2</sub>S es un gasotransmisor capaz de cruzar las membranas celulares, incluida la BHE. De hecho, la administración intraperitoneal de NaHS induce un aumento de H<sub>2</sub>S en distintas áreas cerebrales (Goodwin et al., 1989). Por lo tanto, los mecanismos que subyacen el resultado observado con NaHS sobre las variables hemodinámicas pueden incluir efectos tanto a nivel central como periférico. En este sentido, se ha reportado que el H<sub>2</sub>S regula el sistema cardiovascular por distintos mecanismos que incluyen: (1) efectos a nivel central en estructuras como el NTS, el PVN y la RVLM (Duan et al., 2015b; Khademullah & Ferguson, 2013; Malik & Ferguson, 2016); (2) la modulación de la transmisión simpática a nivel periférico (Centurión et al., 2016; Guo et al., 2016); modulación del corazón (Geng et al., 2004) y de los vasos sanguíneos (Hosoki et al., 1997). Para fines de este proyecto, únicamente se contempló la inhibición del tono simpático vasopresor.

### **8.5. Disfunción autonómica**

El sistema cardiovascular está ampliamente regulado por distintos mecanismos, incluido el sistema nervioso autónomo (McCorry, 2007). En este sentido, diversos estudios clínicos y preclínicos han demostrado un desbalance entre las dos ramas del sistema nervioso autónomo, mismo que se ha calculado siguiendo distintas aproximaciones experimentales y mediciones después del TCE (Baguley et al., 2006; Bishop et al., 2017; Hilz et al., 2017). Además, se ha observado un incremento en la síntesis y liberación

de monoaminas en pacientes y en modelos animales del TCE que se propone como el responsable de la disfunción autonómica post-TCE (Fernandez-Ortega et al., 2017; Rosner et al., 1984; Tümer et al., 2013).

A pesar de que los estudios previamente mencionados proveen información útil sobre el estado de la actividad del sistema nervioso simpático después del TCE, nosotros medimos tanto la reactividad de las fibras simpáticas como la funcionalidad de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos en los vasos sanguíneos mediante la estimulación eléctrica selectiva del tono simpático vasopresor y la administración de agonistas exógenos selectivos para los receptores adrenérgicos  $\alpha_{1/2}$ .

Nuestros resultados mostraron un incremento en la actividad simpática desde el día 7 y hasta el día 28 post-TCE severo. Además, encontramos que no solo se modificó la transmisión en las neuronas simpáticas, sino que también existió una disminución en la funcionalidad de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos localizados en los vasos sanguíneos. Acorde con esto, en estudios previos se reporta la existencia de una alteración en la señalización del receptor  $\alpha$  adrenérgico en el cerebro de los animales sometidos a un TCE (Kobori et al., 2011; Levin et al., 1994).

Teniendo en cuenta la disminución de las respuestas vasopresoras inducidas por UK 14,304, un agonista adrenérgico selectivo para los  $\alpha_2$ , el incremento en la actividad simpática puede explicarse por una disminución de los receptores  $\alpha_2$  que median la automodulación en las neuronas simpáticas. En este sentido, previamente se demostró que la activación de los receptores  $\alpha_2$  con dexmedetomidina, un agonista altamente selectivo para estos receptores, indujo efectos neuroprotectores, por lo que se ha propuesto como un tratamiento para la disfunción autonómica paroxística con distonía observada después del TCE (Goddeau et al., 2007; Wu et al., 2018). De manera controversial, el tratamiento con atipamezole, un antagonista selectivo de los receptores  $\alpha_2$ , mejoró la función sensoriomotora y redujo la susceptibilidad de crisis en un modelo experimental con pentilinetetrazol sin afectar el desarrollo

---

de epilepsia post-traumática y las alteraciones observadas en el laberinto acuático de Morris respecto que evalúa aprendizaje y memoria espacial (Nissinen et al., 2017).

De manera interesante, la administración subcrónica con NaHS a las dosis de 3.1 y 5.6 mg/kg previene la hiperactividad simpática post-TCE severo. Acorde con lo anterior, ha sido demostrado un efecto simpato-inhibidor en distintos estudios *in vitro* e *in vivo* en condiciones fisiológicas (Centurión et al., 2016; Dominguez-Rodriguez et al., 2017) y en un modelo de obesidad inducida por dieta rica en grasas (Gomez et al., 2019).

De manera inesperada, los resultados obtenidos en este trabajo muestran una disminución en las respuestas vasopresoras inducidas por la noradrenalina (agonista  $\alpha_{1/2}$  adrenérgico) pero no por la metoxamina (agonista selectivo  $\alpha_1$  adrenérgico) o UK 14,304 (agonista selectivo  $\alpha_2$  adrenérgico) después de la administración del tratamiento subcrónico de NaHS a las dosis de 3.1 y 5.6 mg/kg. Este efecto que solo se observa con la activación simultánea de los receptores  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  adrenérgicos con noradrenalina sugiere la formación de heterodímeros entre ambos receptores, ya que las respuestas no se modificaron cuando se activaron los receptores de manera independiente con la administración de metoxamina o UK 14,304. Acorde con esto, previamente hemos demostrado que el tratamiento crónico con NaHS a la dosis de 5.6 mg/kg disminuye las respuestas vasopresoras inducidas por la noradrenalina (0.3  $\mu$ g/kg) y por la metoxamina (30  $\mu$ g/kg) (Gomez et al., 2019).

En este contexto, se ha demostrado previamente que los receptores  $\alpha$  adrenérgicos tienen la capacidad de formar homo- y heterodímeros que contribuyen al desarrollo de la hipertensión (Sun et al., 2015; Ziolkowski and Grover, 2010). Además, los heterodímeros entre receptores GPCR han sido ampliamente implicados en la modulación de las conexiones cerebrales en condiciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas (Borroto-Escuela et al., 2017). Sin embargo, se requieren más estudios para explorar esta posibilidad. Por otra parte, la disminución en las respuestas vasopresoras inducidas por

estimulación eléctrica selectiva del tono simpático puede ser explicada también por una reducción en la activación de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos.

Como se mencionó anteriormente, el NaHS es capaz de disminuir la actividad simpática por inhibición de la RVLM (Guo et al., 2011). Sin embargo, esta posibilidad puede ser excluida de nuestros resultados debido a que en el modelo de rata descerebrada y desmedulada no existe influencia del sistema nervioso central en la modulación del sistema cardiovascular (Centurión et al., 2009). Por lo tanto, se puede sugerir que el efecto del NaHS, en nuestras condiciones experimentales, depende exclusivamente de la modulación de la transmisión simpática a nivel periférico.

Por otra parte, se debe tener en cuenta que el sistema nervioso autónomo parasimpático también regula al sistema cardiovascular. De hecho el sistema nervioso parasimpático ejerce efectos opuestos a los que ejerce el sistema nervioso simpático en el sistema cardiovascular. Así, una alteración en su modulación puede contribuir al desarrollo de alteraciones en la presión arterial. En este sentido, ya ha sido reportado que la actividad del sistema nervioso parasimpático se encuentra disminuida en los pacientes que sufrieron un TCE, y que esto puede contribuir al desarrollo de disautonomía y, por tanto, de las alteraciones en las variables hemodinámicas post-TCE (Baguley et al., 2006; Hiltz et al., 2011, 2016, 2017). Acorde con lo anterior, se propone que la estimulación del nervio vago induce efectos benéficos en condiciones de TCE (Srihagulang et al., 2022). Por otra parte, la inyección del NaHS en el núcleo motor dorsal del nervio vago genera una disminución significativa de la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca (Sun et al., 2015). Asimismo, la administración inhalada del NaHS produce hipersensibilidad de las neuronas vagales sensibles a capsaicina de la rata por activación del TRPA1 (Hsu et al., 2013). Sin embargo, es importante mencionar que los vasos sanguíneos de resistencia no poseen inervación parasimpática pero la activación de dicho sistema provoca una disminución en la presión arterial al

promover respuestas inotrópicas negativas (disminución de la frecuencia cardiaca).

Aunado a lo anterior, el tono vascular también está regulado por la inervación de neuronas sensoriales que liberan péptidos relajantes como el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP.) En este contexto, se ha demostrado que los niveles de CGRP son significativamente menores en pacientes que sufrieron un TCE severo comparado con el grupo de pacientes que tuvieron un TCE de leve a moderado, y que esta disminución está asociada con un peor pronóstico en los pacientes (Chen et al., 2018). De hecho, la administración de CGRP exógeno promueve efectos neuroprotectores por disminución de la apoptosis y la autofagia a través de la activación de la vía Akt/mTOR (Tian et al., 2020). En este sentido, estudios *in vitro* han reportado que la administración de donadores de H<sub>2</sub>S promueve la liberación de CGRP por parte de las neuronas sensoriales (Huerta de la Cruz et al., 2022a). Lo anterior genera respuestas de vasorelajación en el músculo liso vascular que produce una disminución en la presión arterial (Eberhardt et al., 2014; Fernandes et al., 2013, 2014a; White et al., 2013).

Dado que en el presente proyecto administramos el tratamiento con NaHS de manera subcrónica y por vía sistémica (i.p.), es posible que el H<sub>2</sub>S esté previniendo el desarrollo de la hipertensión post-TCE por mecanismos indirectos que involucren la activación del sistema nervioso parasimpático que inerva el corazón o la activación de las neuronas sensoriales perivasculares que liberan CGRP. Sin embargo, ambas posibilidades se encuentran fuera del alcance de este trabajo.

## 9. CONCLUSIÓN

El tratamiento subcrónico con NaHS previene el incremento en la presión arterial inducido por el TCE severo a través de la disminución de la actividad simpática y se correlaciona con la restauración de la expresión proteica de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en el tallo y en el hipotálamo.

## 10. PERSPECTIVAS

- 10.1.** Dado que en este trabajo se encontró que la administración exógena de H<sub>2</sub>S es capaz de restablecer la expresión de las enzimas después del TCE severo, será necesario demostrar si el H<sub>2</sub>S es capaz de regular la expresión génica a través de la sulfhidración de Keap1 y la consecuente liberación de Nrf2.
- 10.2.** Será necesario determinar si, además de los efectos sobre las fibras simpáticas, el tratamiento subcrónico con NaHS revierte la hiperactividad simpática e hipertensión post-TCE al prevenir la excitotoxicidad en la RVLM mediante una disminución en el estrés oxidante y la restauración de la expresión del transportador GLT-1.
- 10.3.** Además del sistema nervioso autónomo, el sistema cardiovascular se regula por mecanismos locales incluidos los que dependen del endotelio. Por lo tanto, sería interesante determinar el efecto del tratamiento subcrónico con NaHS sobre la disfunción endotelial inducida por el estrés oxidante después del TCE.
- 10.4.** Es bien sabido que el sistema nervioso parasimpático y el sistema nervioso sensorial regulan el tono vascular. En este sentido, el TCE promueve una disminución de la actividad del sistema nervioso parasimpático y sensorial. Además, se ha reportado que el H<sub>2</sub>S es capaz de modular la actividad de las neuronas sensoriales que regulan el tono vascular. Por lo tanto, sería de interés investigar si las respuestas vasculares inducidas por estimulación de estos sistemas se encuentran alterados después del TCE y si el H<sub>2</sub>S es capaz de revertir dichas alteraciones.
- 10.5.** El H<sub>2</sub>S tiene efectos relajantes en el músculo liso *per se* y regula el tono vascular. Por lo que, sería de interés evaluar si existen cambios en la expresión proteica de las enzimas que sintetizan H<sub>2</sub>S en vasos sanguíneos de resistencia, si las respuestas vasorelajantes inducidas

por H<sub>2</sub>S se encuentran alteradas, y si esto contribuye al desarrollo de la hipertensión observada después del TCE.

- 10.6.** El hipotálamo está altamente relacionado con el control del peso corporal, la ingesta, la saciedad y la integración de la respuesta al estrés. En este contexto, sería pertinente determinar el efecto del tratamiento subcrónico con NaHS en otras alteraciones post-TCE como el control del peso corporal, la ingesta, la saciedad y la respuesta cardiovascular frente al estrés.
- 10.7.** Respecto al peso corporal, los resultados de este proyecto muestran que el TCE promueve una disminución del peso corporal y que el tratamiento con NaHS previene dicha disminución de manera parcial. Por lo tanto, resultaría de interés investigar los mecanismos que subyacen a estos efectos y que podrían involucrar (1) efectos a nivel del tejido adiposo, (2) el control hipotalámico de la ingesta y la saciedad, y (3) efectos en el sistema nervioso entérico o la microbiota.
- 10.8.** El tallo cerebral regula una gran variedad de funciones autonómicas como la respiración. Durante el desarrollo de este proyecto se tuvo una mortalidad de aproximadamente el 35% debido a la apnea post-TCE. Por lo tanto, sería interesante determinar el efecto del pre-tratamiento con NaHS en la mortalidad derivada de la apnea después de la inducción del traumatismo.

---

**11.REFERENCIAS**

- AANS, 2021. Traumatic Brain Injury – Causes, Symptoms and Treatments.
- Abe, K., Kimura, H., 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.* 16, 1066–71.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
- Aburto, T.K., Lajoie, C., Morgan, K.G., 1993. Mechanisms of signal transduction during alpha 2-adrenergic receptor-mediated contraction of vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 72, 778–85.
- Agrawal, N., Banerjee, R., 2008. Human polycomb 2 protein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine  $\beta$ -synthase sumoylation. *PLoS One* 3.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004032>
- Ahmadi, N., Hajsadeghi, F., Yehuda, R., Anderson, N., Garfield, D., Ludmer, C., Vaidya, N., 2015. Traumatic brain injury, coronary atherosclerosis and cardiovascular mortality. *Brain Inj.* 29, 1635–1641.  
<https://doi.org/10.3109/02699052.2015.1075149>
- An, C., Jiang, X., Pu, H., Hong, D., Zhang, W., Hu, X., Gao, Y., 2016. Severity-Dependent Long-Term Spatial Learning-Memory Impairment in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Transl. Stroke Res.* 7, 512–520. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0483-5>
- Azevedo, E.P., Ivan, V.J., Friedman, J.M., Stern, S.A., 2022. Higher-Order Inputs Involved in Appetite Control. *Biol. Psychiatry* 91.  
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2021.07.015>
- Bae, E.J., Ho, D.H., Park, E., Jung, J.W., Cho, K., Hong, J.H., Lee, H.J., Kim, K.P., Lee, S.J., 2013. Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal Promotes Seeding-Capable Oligomer Formation and Cell-to-Cell Transfer of  $\alpha$ -Synuclein. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 770.  
<https://doi.org/10.1089/ARS.2011.4429>
- Baguley, I.J., 2008. The excitatory:inhibitory ratio model (EIR model): An integrative explanation of acute autonomic overactivity syndromes. *Med.*

- Hypotheses 70, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.04.037>
- Baguley, I.J., Heriseanu, R.E., Felmingham, K.L., Cameron, I.D., 2006. Dysautonomia and heart rate variability following severe traumatic brain injury. *Brain Inj.* 20, 437–444. <https://doi.org/10.1080/02699050600664715>
- Baguley, I.J., Nott, M.T., Slewa-Younan, S., Heriseanu, R.E., Perkes, I.E., 2009. Diagnosing Dysautonomia After Acute Traumatic Brain Injury: Evidence for Overresponsiveness to Afferent Stimuli. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 90, 580–586. <https://doi.org/10.1016/j.apmr.2008.10.020>
- Baker, A.J., Moulton, R.J., MacMillan, V.H., Shedden, P.M., 1993. Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans. *J. Neurosurg.* 79, 369–372. <https://doi.org/10.3171/jns.1993.79.3.0369>
- Beauchamp, R.O., Bus, J.S., Popp, J.A., Boreiko, C.J., Andjelkovich, D.A., Leber, P., 1984. A Critical Review of the Literature on Hydrogen Sulfide Toxicity. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 13, 25–97. <https://doi.org/10.3109/10408448409029321>
- Beier, J., Anthes, N., Wahl, J., Harvati, K., 2018. Similar cranial trauma prevalence among Neanderthals and Upper Palaeolithic modern humans. *Nature* 563, 686–690. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0696-8>
- Benhar, M., Forrester, M.T., Stamler, J.S., 2009. Protein denitrosylation: Enzymatic mechanisms and cellular functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/nrm2764>
- Bhowmick, S., D’Mello, V., Ponery, N., Abdul-Muneer, P.M., 2018. Neurodegeneration and Sensorimotor Deficits in the Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Brain Sci.* 8. <https://doi.org/10.3390/BRAINSCI8010011>
- Bishop, S., Dech, R., Baker, T., Butz, M., Aravinthan, K., Neary, J.P., 2017. Parasympathetic baroreflexes and heart rate variability during acute stage of sport concussion recovery. *Brain Inj.* 31, 247–259.

- 
- <https://doi.org/10.1080/02699052.2016.1226385>
- Biswas, A., Scott, W., Sommerauer, J., Luckett, P., 2000. Heart rate variability after acute traumatic brain injury in children. *Crit. Care Med.* 28, 3907–3912. <https://doi.org/10.1097/00003246-200012000-00030>
- Boeve, B.F., Wijdicks, F.M., Benarroch, E.E., Schmidt, K.D., 1998. Paroxysmal Sympathetic Storms (â€œDiencephalic Seizuresâ€?) After Severe Diffuse Axonal Head Injury, Mayo Foundation for Medical Education and Research. [https://doi.org/10.1016/S0025-6196\(11\)63647-1](https://doi.org/10.1016/S0025-6196(11)63647-1)
- Bostan, A.C., Strick, P.L., 2018. The basal ganglia and the cerebellum: nodes in an integrated network. *Nat. Rev. Neurosci.* 2018 19, 338–350. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0002-7>
- Broadley, K.J., 1996. Anatomy and physiology of the autonomic nervous system, in: *Autonomic Pharmacology*. Taylor & Francis, pp. 2–36.
- Cai, J., Shi, X., Wang, H., Fan, J., Feng, Y., Lin, X., Yang, J., Cui, Q., Tang, C., Xu, G., Geng, B., 2016. Cystathionine  $\gamma$  lyase–hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1861, 419–429. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.03.001>
- Campolo, M., Esposito, E., Ahmad, A., Di Paola, R., Paterniti, I., Cordaro, M., Bruschetta, G., Wallace, J.L., Cuzzocrea, S., 2014. Hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor ATB-346 enhances motor function and reduces cortical lesion volume following traumatic brain injury in mice. *J. Neuroinflammation* 11, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0196-1>
- Cederberg, D., Siesjö, P., 2010. What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Childs. Nerv. Syst.* 26, 221–226. <https://doi.org/10.1007/S00381-009-1029-X>
- Centers for Disease Control and Prevention, 2013. CDC - Statistics - Traumatic Brain Injury - Injury Center [WWW Document]. USA.gov.

- Centers for Disease Control and Prevention, 2019. Traumatic Brain Injury & Concussion [WWW Document]. URL <https://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/index.html> (accessed 3.18.20).
- Centurión, D., Cobos-Puc, L.E., Ramírez-Rosas, M.B., Gómez-Díaz, B., Sánchez-López, A., 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: Rocha, L., Granados-Soto, V. (Eds.), *Models in Neuropharmacology*. Kerala, India: Transworld Research Network., pp. 91–97.
- Centurión, D., de la Cruz, S.H., Castillo-Santiago, S. V, Becerril-Chacón, M.E., Torres-Pérez, J.A., Sánchez-López, A., 2018. NaHS prejunctionally inhibits the cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 823, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.01.030>
- Centurión, D., Huerta de la Cruz, S., Gutiérrez-Lara, E.J., Beltrán-Ornelas, J.H., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.11.057>
- Chang, L., Garcia-Barrio, M.T., Chen, Y.E., 2020. Perivascular Adipose Tissue Regulates Vascular Function by Targeting Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40, 1094–1109. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.312464>
- Che, X., Fang, Y., Si, X., Wang, J., Hu, X., Reis, C., Chen, S., 2018. The role of gaseous molecules in traumatic brain injury: An updated review. *Front. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00392>
- Chen, J., Chen, W., Han, K., Qi, E., Chen, R., Yu, M., Hou, L., Lv, L., 2019. Effect of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla on sympathetic hyperactivity after traumatic brain injury. *Eur. J. Neurosci.* 50, 1972–1980. <https://doi.org/10.1111/ejn.14374>
- Chen, L.X., Zhang, W.F., Wang, M., Jia, P.F., 2018. Relationship of calcitonin gene-related peptide with disease progression and prognosis of patients

- with severe traumatic brain injury. *Neural Regen. Res.* 13, 1782.  
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.238619>
- Chen, X., Jhee, K.H., Kruger, W.D., 2004. Production of the neuromodulator H<sub>2</sub>S by cystathionine β-synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 279, 52082–52086.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C400481200>
- Chen, X., Taylor-Nguyen, N.N., Riley, A.M., Herring, B.P., White, F.A., Obukhov, A.G., 2019. The TRPC6 inhibitor, larixyl acetate, is effective in protecting against traumatic brain injury-induced systemic endothelial dysfunction. *J. Neuroinflammation* 16, 1–13.  
<https://doi.org/10.1186/s12974-019-1407-6>
- Chiku, T., Padovani, D., Zhu, W., Singh, S., Vitvitsky, V., Banerjee, R., 2009. H<sub>2</sub>S biogenesis by human cystathionine γ-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem.* 284, 11601–11612.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M808026200>
- Chou, S., Ogden, J., Pohl, H., Scinicariello, F., 2016. Toxicological Profile for Hydrogen Sulfide and Carbonyl Sulfide.
- Clifton, G.L., Robertson, C.S., Kyper, K., Taylor, A.A., Dhekne, R.D., Grossman, R.G., 1983. Cardiovascular response to severe head injury. *J. Neurosurg.* 59, 447–454. <https://doi.org/10.3171/JNS.1983.59.3.0447>
- Clifton, G.L., Ziegler, M.G., Grossman, R.G., 1981. Circulating Catecholamines and Sympathetic Activity after Head Injury. *Neurosurgery* 8, 10–14. <https://doi.org/10.1227/00006123-198101000-00003>
- Coletti, R., de Lima, J.B.M., Vechiato, F.M.V., de Oliveira, F.L., Debarba, L.K., Almeida-Pereira, G., Elias, L.L.K., Antunes-Rodrigues, J., 2019. Nitric oxide acutely modulates hypothalamic and neurohypophyseal carbon monoxide and hydrogen sulphide production to control vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release in rats. *J. Neuroendocrinol.* 31. <https://doi.org/10.1111/jne.12686>

- Connor, R., 1969. Myocardial damage secondary to brain lesions. *Am. Heart J.* 78, 145–148. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(69\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0002-8703(69)90001-5)
- Cooper, A.J.L., 1983. Biochemistry of Sulfur-Containing Amino Acids. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 187–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.001155>
- Corsello, T., Komaravelli, N., Casola, A., 2018. Role of hydrogen sulfide in nrf2-and sirtuin-dependent maintenance of cellular redox balance. *Antioxidants* 7. <https://doi.org/10.3390/antiox7100129>
- Cotecchia, S., 2010. The  $\alpha$ 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* 30, 410–9. <https://doi.org/10.3109/10799893.2010.518152>
- D’Emmanuele di Villa Bianca, R., Mitidieri, E., Fusco, F., Russo, A., Pagliara, V., Tramontano, T., Donnarumma, E., Mirone, V., Cirino, G., Russo, G., Sorrentino, R., 2016. Urothelium muscarinic activation phosphorylates CBS Ser227 via cGMP/PKG pathway causing human bladder relaxation through H<sub>2</sub>S production. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep31491>
- Daglas, M., Adlard, P.A., 2018. The Involvement of Iron in Traumatic Brain Injury and Neurodegenerative Disease. *Front. Neurosci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00981>
- Dampney, R.A.L., 2016. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv. Physiol. Educ.* 40, 283–296. <https://doi.org/10.1152/advan.00027.2016>
- Dawe, G.S., Han, S.P., Bian, J.S., Moore, P.K., 2008. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience* 152, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.008>
- De Tanti, A., Gasperini, G., Rossini, M., 2005. Paroxysmal episodic hypothalamic instability with hypothermia after traumatic brain injury. *Brain Inj.* 19, 1277–1283. <https://doi.org/10.1080/02699050500309270>
- Dewan, M.C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R.E., Hung, Y.-C., Panchak, M., Agrawal, A., Adeleye, A.O., Shrimel, M.G., Rubiano, A.M., Rosenfeld,

- 
- J. V., Park, K.B., 2018. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 130, 1080–1097.  
<https://doi.org/10.3171/2017.10.JNS17352>
- Dolce, G., Quintieri, M., Leto, E., Milano, M., Pileggi, A., Lagani, V., Pignolo, L., 2008. Dysautonomia and Clinical Outcome in Vegetative State. *J. Neurotrauma* 1082, 1079–1082. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0536>
- Dombkowski, R.A., Russell, M.J., 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, R678-85.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00419.2003>
- Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A., Bezzi, P., 2006. P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J. Biol. Chem.* 281, 30684–30696. <https://doi.org/10.1074/JBC.M606429200>
- Dominguez-Rodriguez, M., Drobny, H., Boehm, S., Salzer, I., 2017. Electrophysiological Investigation of the Subcellular Fine Tuning of Sympathetic Neurons by Hydrogen Sulfide. *Front. Pharmacol.* 8, 522.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00522>
- Dorsett, C.R., McGuire, J.L., Depasquale, E.A.K., Gardner, A.E., Floyd, C.L., McCullumsmith, R.E., 2017. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 34, 263–272.  
<https://doi.org/10.1089/NEU.2015.4373>
- Duan, H., Li, L., Shen, S., Ma, Y., Yin, X., Liu, Z., Yuan, C., Wang, Y., Zhang, J., 2020. Hydrogen Sulfide Reduces Cognitive Impairment in Rats After Subarachnoid Hemorrhage by Ameliorating Neuroinflammation Mediated by the TLR4/NF-κB Pathway in Microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 210.  
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00210/BIBTEX>
- Duan, H.Z., Wu, C.W., Shen, S.L., Zhang, J.Y., Li, L., 2021. Neuroprotective Effects of Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage in Rats by Calcium Channel Mediating Hydrogen Sulfide. *Cell. Mol. Neurobiol.* 41, 1707–1714. <https://doi.org/10.1007/S10571-020-00940-0/FIGURES/3>

- Duan, X.C., Guo, R., Liu, S.Y., Xiao, L., Xue, H.M., Guo, Q., Jin, S., Wu, Y.M., 2015a. Gene transfer of cystathionine  $\beta$ -synthase into RVLM increases hydrogen sulfide-mediated suppression of sympathetic outflow via KATP channel in normotensive rats. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 308, H603–H611. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00693.2014>
- Duan, X.C., Liu, S.Y., Guo, R., Xiao, L., Xue, H.M., Guo, Q., Jin, S., Wu, Y.M., 2015b. Cystathionine- $\beta$ -Synthase Gene Transfer Into Rostral Ventrolateral Medulla Exacerbates Hypertension via Nitric Oxide in Spontaneously Hypertensive Rats. *Am. J. Hypertens.* 28, 1106–1113. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu299>
- Dupuyturen, M., 1806. Rapport sur une espèce de mephitisme des fosses d'aisance, produite par le gas azote. *J. Med.* IX, 187–213.
- Durham, S.R., Clancy, R.R., Leuthardt, E., Sun, P., Kamerling, S., Dominguez, T., Duhaime, A.C., 2000. CHOP Infant Coma Scale ("Infant Face Scale"): a novel coma scale for children less than two years of age. *J. Neurotrauma* 17, 729–737. <https://doi.org/10.1089/NEU.2000.17.729>
- Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., Kichko, T.I., de la Roche, J., Fischer, M., Suárez, S.A., Bikiel, D., Dorsch, K., Leffler, A., Babes, A., Lampert, A., Lennerz, J.K., Jacobi, J., Martí, M.A., Doctorovich, F., Högestätt, E.D., Zygmunt, P.M., Ivanovic-Burmazovic, I., Messlinger, K., Reeh, P., Filipovic, M.R., 2014. H<sub>2</sub>S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat. Commun.* 5, 4381. <https://doi.org/10.1038/ncomms5381>
- Emir, M., Ozisik, K., Cagli, K., Ozisik, P., Tuncer, S., Bakuy, V., Yildirim, E., Kilinc, K., Gol, K., 2005. Beneficial effect of methylprednisolone on cardiac myocytes in a rat model of severe brain injury. *Tohoku J. Exp. Med.* 207, 119–124. <https://doi.org/10.1620/tjem.207.119>
- Eric Nyam, T.T., Ho, C.H., Chio, C.C., Lim, S.W., Wang, J.J., Chang, C.H., Kuo, J.R., Wang, C.C., 2019. Traumatic Brain Injury Increases the Risk of Major Adverse Cardiovascular and Cerebrovascular Events: A 13-

- 
- Year, Population-Based Study. *World Neurosurg.* 122, e740–e753.  
<https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.10.130>
- Evans, J., 2013. *Lo esencial en sistema cardiovascular.* Elsevier España.
- Faden, A.I., Demediuk, P., Panter, S.S., Vink, R., 1989. The Role of Excitatory Amino Acids and NMDA Receptors in Traumatic Brain Injury. *Science* (80-. ). 244, 798–800. <https://doi.org/10.1126/science.2567056>
- Fathizadeh, P., Shoemaker, W., Wo, C., Colombo, J., 2004. Autonomic activity in trauma patients based on variability of heart rate and respiratory rate. *Crit. Care Med.* 32, 1300–1305.  
<https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000127776.78490.E4>
- Félétou, M., Vanhoutte, P.M., 2013. Endothelium-Dependent Hyperpolarization. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 61, 91–92.  
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31828197bc>
- Felton, J.S., 1997. The heritage of Bernardino Ramazzini. *Occup. Med.* (Lond). 47, 167–79.
- Fernandes, V.S., Ribeiro, A.S., Martínez, P., Ló Pez-Oliva, M.E., Barahona, M.V., Orensanz, L.M., Martínez-Sá Enz, A., Recio, P., Benedito, S., Bustamante, S., Garcí-Sacristá N, A., Prieto, D., Herná Ndez, M., 2014a. Hydrogen sulfide plays a key role in the inhibitory neurotransmission to the pig intravesical ureter. *PLoS One* 9, 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113580>
- Fernandes, V.S., Ribeiro, A.S.F., Barahona, M.V., Orensanz, L.M., Martínez-Sáenz, A., Recio, P., Martínez, A.C., Bustamante, S., Carballido, J., García-Sacristán, A., Prieto, D., 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, 746–56. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.02.103>
- Fernandes, V.S., Ribeiro, A.S.F., Martínez, P., López-Oliva, M.E., Barahona, M.V., Orensanz, L.M., Martínez-Sáenz, A., Recio, P., Benedito, S., Bustamante, S., García-Sacristán, A., Prieto, D., Hernández, M., 2014b. Hydrogen sulfide plays a key role in the inhibitory neurotransmission to

- the pig intravesical ureter. *PLoS One* 9, e113580.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113580>
- Fernandez-Ortega, J.F., Baguley, I.J., Gates, T.A., Garcia-Caballero, M., Quesada-Garcia, J.G., Prieto-Palomino, M.A., 2017. Catecholamines and paroxysmal sympathetic hyperactivity after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 34, 109–114. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4364>
- Finkelstein, J.D., 1990. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.* 1, 228–37.
- Foley, N., Marshall, S., Pikul, J., Salter, K., Teasell, R., 2009. Hypermetabolism following Moderate to Severe Traumatic Acute Brain Injury: A Systematic Review. *J. Neurotrauma* 25, 1415–1431.  
<https://doi.org/10.1089/NEU.2008.0628>
- Fouda, M.A., El-Sayed, S.S., Abdel-Rahman, A.A., 2018. Restoration of rostral ventrolateral medulla cystathionine-g lyase activity underlies moxonidine-Evoked neuroprotection and sympathoinhibition in diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 364, 170–178.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.117.243865>
- Frieden, T.R., Houry, D., Baldwin, G., 2015. Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation. *CDC NIH Rep. to Congr.* 1–74. <https://doi.org/10.3171/2009.10.JNS091500>
- Fu, M., Zhang, W., Yang, G., Wang, R., 2012. Is cystathionine gamma-lyase protein expressed in the heart? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428, 469–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.10.084>
- Gan, X.B., Liu, T.Y., Xiong, X.Q., Chen, W.W., Zhou, Y.B., Zhu, G.Q., 2012. Hydrogen Sulfide in Paraventricular Nucleus Enhances Sympathetic Activity and Cardiac Sympathetic Afferent Reflex in Chronic Heart Failure Rats. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050102>
- Ganster, F., Burban, M., de la Bourdonnaye, M., Fizanne, L., Douay, O., Loufrani, L., Mercat, A., Calès, P., Radermacher, P., Henrion, D., Asfar, P., Meziani, F., 2010. Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated

- hemorrhagic shock in rats. *Crit. Care* 14, 1–11.  
<https://doi.org/10.1186/CC9257/COMMENTS>
- GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators, 2019. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18, 56–87.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30415-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30415-0)
- Geng, B., Cai, B., Liao, F., Zheng, Y., Zeng, Q., Fan, X., Gong, Y., Yang, J., Cui, Q.H., Tang, C., Xu, G.H., 2013. Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. *PLoS One* 8, e73892.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073892>
- Geng, B., Yang, J., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., Du, J., Tang, C., 2004. H<sub>2</sub>S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 362–8.
- Gheibi, S., Aboutaleb, N., Khaksari, M., Kalalian-Moghaddam, H., Vakili, A., Asadi, Y., Mehrjerdi, F.Z., Gheibi, A., 2014. Hydrogen Sulfide Protects the Brain Against Ischemic Reperfusion Injury in a Transient Model of Focal Cerebral Ischemia. *J. Mol. Neurosci.* 54, 264–270.  
<https://doi.org/10.1007/S12031-014-0284-9>
- Gillespie, J.S., 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, 78–87.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1967.tb02114.x>
- Globus, M.Y.-., Alonso, O., Dietrich, W.D., Busto, R., Ginsberg, M.D., 1995. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J. Neurochem.* 65, 1704–1711.  
<https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1995.65041704.X>
- Goddeau, R.P., Silverman, S.B., Sims, J.R., 2007. Dexmedetomidine for the treatment of paroxysmal autonomic instability with dystonia. *Neurocrit. Care* 7, 217–220. <https://doi.org/10.1007/s12028-007-0066-0>

- 
- Godo, S., Shimokawa, H., 2017. Endothelial Functions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, e108–e114.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813>
- Goldstein, B., Towell, D., Lai, S., Sonnenthal, K., Kimberly, B., 2017. Uncoupling of the autonomic and cardiovascular systems in acute brain injury. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 275, R1287–R1292.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.4.r1287>
- Gomez, C.B., de la Cruz, S.H., Medina-Terol, G.J., Beltran-Ornelas, J.H., Sánchez-López, A., Silva-Velasco, D.L., Centurión, D., 2019. Chronic administration of NaHS and L-Cysteine restores cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 863, 172707.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172707>
- Goodwin, L.R., Francom, D., Dieken, F.P., Taylor, J.D., Warenycia, M.W., Reiffenstein, R.J., Dowling, G., 1989. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J. Anal. Toxicol.* 13, 105–9.  
<https://doi.org/10.1093/jat/13.2.105>
- Graf, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G., Eaton, J.W., 1984. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 259, 3620–3624.  
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43139-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43139-5)
- Gren, M., Shahim, P., Lautner, R., Wilson, D.H., Andreasson, U., Norgren, N., Blennow, K., Zetterberg, H., 2016. Blood biomarkers indicate mild neuroaxonal injury and increased amyloid  $\beta$  production after transient hypoxia during breath-hold diving. *Brain Inj.* 30, 1226–1230.  
<https://doi.org/10.1080/02699052.2016.1179792>
- Griesbach, G.S., Hovda, D.A., Tio, D.L., Taylor, A.N., 2011. Heightening of the stress response during the first weeks after a mild traumatic brain injury. *Neuroscience* 178, 147–158.  
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.01.028>
- Guo, C., Liang, F., Shah Masood, W., Yan, X., 2014. Hydrogen sulfide

- protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF-κB dependent anti-inflammation pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 725, 70–78.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.009>
- Guo, Q., Jin, S., Wang, X.L., Wang, R., Xiao, L., He, R.R., Wu, Y.M., 2011. Hydrogen sulfide in the rostral ventrolateral medulla inhibits sympathetic vasomotor tone through ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 458–465. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.180711>
- Guo, Q., Wu, Y., Xue, H., Xiao, L., Jin, S., Wang, R., 2016. Perfusion of isolated carotid sinus with hydrogen sulfide attenuated the renal sympathetic nerve activity in anesthetized male rats. *Physiol. Res.* 65, 413–23. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933050>
- Hadadha, M., Vakili, A., Bandegi, A.R., 2015. Effect of the Inhibition of Hydrogen Sulfide Synthesis on Ischemic Injury and Oxidative Stress Biomarkers in a Transient Model of Focal Cerebral Ischemia in Rats. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 24, 2676–2684.  
<https://doi.org/10.1016/J.JSTROKECEREBROVASDIS.2015.07.020>
- Hammond, F.M., Corrigan, J.D., Ketchum, J.M., Malec, J.F., Dams-O'Connor, K., Hart, T., Novack, T.A., Bogner, J., Dahdah, M.N., Whiteneck, G.G., 2019. Prevalence of Medical and Psychiatric Comorbidities Following Traumatic Brain Injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 34, 1.  
<https://doi.org/10.1097/htr.0000000000000465>
- Han, X., Mao, Z.C., Wang, S., Xin, Y., Li, P., Maharjan, S., Zhang, B., 2020. GYY4137 protects against MCAO via p38 MAPK mediated anti-apoptotic signaling pathways in rats. *Brain Res. Bull.* 158, 59–65.  
<https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2020.02.015>
- Hanscom, M., Loane, D.J., Shea-Donohue, T., 2021. Brain-gut axis dysfunction in the pathogenesis of traumatic brain injury. *J. Clin. Invest.* 131. <https://doi.org/10.1172/JCI143777>
- Harish, G., Mahadevan, A., Pruthi, N., Sreenivasamurthy, S., Puttamalles, V., Keshava Prasad, T., Shankar, S., Srinivas Bharath, M., 2015.

- Characterization of traumatic brain injury in human brains reveals distinct cellular and molecular changes in contusion and pericontusion. *J. Neurochem.* 134, 156–172. <https://doi.org/10.1111/JNC.13082>
- Hassan, M.I., Boosen, M., Schaefer, L., Kozłowska, J., Eisel, F., Von Knethen, A., Beck, M., Hemeida, R.A.M., El-Moselhy, M.A.M., Hamada, F.M.A., Beck, K.F., Pfeilschifter, J., 2012. Platelet-derived growth factor-BB induces cystathionine ly-lyase expression in rat mesangial cells via a redox-dependent mechanism. *Br. J. Pharmacol.* 166, 2231–2242. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01949.x>
- Hausser, N., Johnson, K., Parsley, M.A., Guptarak, J., Spratt, H., Sell, S.L., 2018. Detecting behavioral deficits in rats after traumatic brain injury. *J. Vis. Exp.* 2018. <https://doi.org/10.3791/56044>
- Hilz, M.J., Defina, P.A., Anders, S., Koehn, J., Lang, C.J., Pauli, E., Flanagan, S.R., Schwab, S., Marthol, H., 2011. Frequency analysis unveils cardiac autonomic dysfunction after mild traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 28, 1727–1738. <https://doi.org/10.1089/neu.2010.1497>
- Hilz, M.J., Liu, M., Koehn, J., Wang, R., Ammon, F., Flanagan, S.R., Hösl, K.M., 2016. Valsalva maneuver unveils central baroreflex dysfunction with altered blood pressure control in persons with a history of mild traumatic brain injury. *BMC Neurol.* 16, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12883-016-0584-5>
- Hilz, M.J., Wang, R., Markus, J., Ammon, F., Hösl, K.M., Flanagan, S.R., Winder, K., Koehn, J., 2017. Severity of traumatic brain injury correlates with long-term cardiovascular autonomic dysfunction. *J. Neurol.* 264, 1956–1967. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8581-1>
- Hörtnagl, H., Hammerle, A., Hackl, J., Brücke, T., Rimpl, E., Hörtnagl, H., 1980. The activity of the sympathetic nervous system following severe head injury. *Intensive Care Med.* 6, 169–177. <https://doi.org/10.1007/BF01757299>
- Hosoki, R., Matsuki, N., Kimura, H., 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric

- oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 527–31.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6878>
- Hourihan, J.M., Kenna, J.G., Hayes, J.D., 2013. The gasotransmitter hydrogen sulfide induces Nrf2-target genes by inactivating the keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between Cys-226 and Cys-613. *Antioxidants Redox Signal.* 19, 465–481.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2012.4944>
- Hsu, C.C., Lin, R.L., Lee, L.Y., Lin, Y.S., 2013. Hydrogen sulfide induces hypersensitivity of rat capsaicin-sensitive lung vagal neurons: role of TRPA1 receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305.  
<https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00202.2013>
- Huang, P., Chen, S., Wang, Y., Liu, J., Yao, Q., Huang, Y., Li, H., Zhu, M., Wang, S., Li, L., Tang, C., Tao, Y., Yang, G., Du, J., Jin, H., 2015. Down-regulated CBS/H<sub>2</sub>S pathway is involved in high-salt-induced hypertension in Dahl rats. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 46, 192–203.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.01.004>
- Huerta de la Cruz, S., Medina-Terol, G.J., Sanchez-Lopez, A., Centurión, D., 2022a. TRPA1, but not TRPV1, is involved in the increase of the non-adrenergic non-cholinergic outflow induced by hydrogen sulfide in pithed rats. *Peptides* submitted.
- Huerta de la Cruz, S., Rocha, L., Santiago-Castañeda, C., Sánchez-López, A., Pinedo-Rodríguez, A.D., Medina-Terol, G.J., Centurión, D., 2022b. Hydrogen Sulfide Subchronic Treatment Improves Hypertension Induced by Traumatic Brain Injury in Rats through Vasopressor Sympathetic Outflow Inhibition. *J. Neurotrauma* 39, 1–15.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2020.7552>
- Impellizzeri, D., Campolo, M., Bruschetta, G., Crupi, R., Cordaro, M., Paterniti, I., Cuzzocrea, S., Esposito, E., 2016. Traumatic Brain Injury Leads to Development of Parkinson's Disease Related Pathology in Mice. *Front. Neurosci.* 10. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2016.00458>
- Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X.-N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G.,

- 
- Kimura, H., 2004. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem. J.* 381, 113–23.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20040243>
- Jiang, W.W., Huang, B.S., Han, Y., Deng, L.H., Wu, L.X., 2017. Sodium hydrosulfide attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing overactivated autophagy in rats. *FEBS Open Bio* 7, 1686–1695. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12301>
- Jiang, X., Huang, Y., Lin, W., Gao, D., Fei, Z., 2013. Protective effects of hydrogen sulfide in a rat model of traumatic brain injury via activation of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reduction of oxidative stress. *J. Surg. Res.* 184.  
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.03.067>
- Johnson, V.E., Stewart, W., Smith, D.H., 2013. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.01.013>
- Johnstone, V.P.A., Wright, D.K., Wong, K., O'Brien, T.J., Rajan, R., Shultz, S.R., 2015. Experimental Traumatic Brain Injury Results in Long-Term Recovery of Functional Responsiveness in Sensory Cortex but Persisting Structural Changes and Sensorimotor, Cognitive, and Emotional Deficits. <https://home.liebertpub.com/neu> 32, 1333–1346.  
<https://doi.org/10.1089/NEU.2014.3785>
- Karimi, S.A., Hosseinmardi, N., Janahmadi, M., Sayyah, M., Hajisoltani, R., 2017. The protective effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on traumatic brain injury (TBI) induced memory deficits in rats. *Brain Res. Bull.* 134, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.014>
- Kaste, M., Hernesniemi, J., Somer, H., Hillbom, M., Konttinen, A., 1981. Creatine kinase isoenzymes in acute brain injury. *J. Neurosurg.* 55, 511–515. <https://doi.org/10.3171/JNS.1981.55.4.0511>
- Katzung, B.G., 2013. *Farmacología básica y clínica*, 12<sup>a</sup>. ed. McGrawHill.
- Keating, C.E., Cullen, D.K., 2021. Mechanosensation in traumatic brain injury. *Neurobiol. Dis.* 148. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2020.105210>

- 
- Keren, O., Yupatov, S., Radai, M.M., Elad-Yarum, R., Faraggi, D., Abboud, S., Ring, H., Groswasser, Z., 2005. Heart rate variability (HRV) of patients with traumatic brain injury (TBI) during the post-insult sub-acute period. *Brain Inj.* 19, 605–611.  
<https://doi.org/10.1080/02699050400024946>
- Khademullah, C.S., Ferguson, A. V., 2013. Depolarizing Actions of Hydrogen Sulfide on Hypothalamic Paraventricular Nucleus Neurons. *PLoS One* 8, 21–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064495>
- Kimura, Hideo, 2012. Metabolic Turnover of Hydrogen Sulfide. *Front. Physiol.* 3, 101. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00101>
- Kimura, H, 2012. Physiological and Pathophysiological functions of hydrogen sulfide, in: Hermann, A., Sitdikova, G.F., Weiger, T.M. (Eds.), *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology*. Springer, pp. 71–98.
- Kimura, H., 2013. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochem. Int.* 63, 492–497.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.09.003>
- Kimura, H., 2014. The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 41, 4–10.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.01.002>
- King, J., Bhimji, S.S., 2018. *Physiology, Cardiovascular, Cardiac Output*, StatPearls. StatPearls Publishing.
- King, M.L., Lichtman, S.W., Seliger, G., Ehert, F.A., Steinberg, J.S., 1997. Heart-rate variability in chronic traumatic brain injury. *Brain Inj.* 11, 445–453. <https://doi.org/10.1080/026990597123421>
- Klabunde, R.E., 2012. *Cardiovascular Physiology Concepts*, 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/citeulike-article-id:2086320>
- Kleinman, L.I., Radford, E.P., 1964. Ventilation standards for small mammals. *J. Appl. Physiol.* 19, 360–2. <https://doi.org/10.1152/jappl.1964.19.2.360>
- Kobori, N., Hu, B., Dash, P.K., 2011. Altered adrenergic receptor signaling following traumatic brain injury contributes to working memory dysfunction. *Neuroscience* 172, 293–302.

- 
- <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.048>
- Kôiv, L., Merisalu, E., Zilmer, K., Tomberg, T., Kaasik, A.E., 1997. Changes of sympatho-adrenal and hypothalamo-pituitary-adrenocortical system in patients with head injury. *Acta Neurol. Scand.* 96, 52–58. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0404.1997.TB00238.X>
- Krishnamoorthy, V., Rowhani-Rahbar, A., Chaikittisilpa, N., Gibbons, E.F., Rivara, F.P., Temkin, N.R., Quistberg, A., Vavilala, M.S., 2017. Association of Early Hemodynamic Profile and the Development of Systolic Dysfunction Following Traumatic Brain Injury. *Neurocrit. Care* 26, 379–387. <https://doi.org/10.1007/s12028-016-0335-x>
- Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D.J., Tonks, N.K., 2011. H<sub>2</sub>S-induced sulfhydration of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Sci. Signal.* 4. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002329>
- Kulkarni, K.H., Monjok, E.M., Zeyssig, R., Kouamou, G., Bongmba, O.N., Opere, C.A., Njie, Y.F., Ohia, S.E., 2009. Effect of hydrogen sulfide on sympathetic neurotransmission and catecholamine levels in isolated porcine iris-ciliary body. *Neurochem. Res.* 34, 400–406. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9793-7>
- Kumar, M., Sandhir, R., 2018. Hydrogen Sulfide in Physiological and Pathological Mechanisms in Brain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 17, 654–670. <https://doi.org/10.2174/1871527317666180605072018>
- Kurland, D., Hong, C., Aarabi, B., Gerzanich, V., Simard, J.M., 2012. Hemorrhagic Progression of a Contusion after Traumatic Brain Injury: A Review. *J. Neurotrauma* 29, 19. <https://doi.org/10.1089/NEU.2011.2122>
- La Fontaine, M.F., Heffernan, K.S., Gossett, J.D., Bauman, W.A., De Meersman, R.E., 2009. Transient suppression of heart rate complexity in concussed athletes. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 148, 101–103. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2009.03.001>
- Larson, B.E., Stockwell, D.W., Boas, S., Andrews, T., Ph, D., Wellman, G.C., Ph, D., Lockette, W., Freeman, K., Ph, D., 2012. Cardiac reactive oxygen

- species after traumatic brain injury. *J. Surg. Res* 173, 1–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.09.056>
- Levin, B.E., Pan, S., Dunn-Meynell, A., 1994. Chronic alterations in rat brain  $\alpha$ -adrenoceptors following traumatic brain injury. *Restor. Neurol. Neurosci.* 7, 5–12. <https://doi.org/10.3233/RNN-1994-7102>
- Li, M., Nie, L., Hu, Y., Yan, X., Xue, L., Chen, L., Zhou, H., Zheng, Y., 2013. Chronic intermittent hypoxia promotes expression of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in adult rat medulla oblongata. *Auton. Neurosci. Basic Clin.* 179, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.08.066>
- Li, T., Liu, H., Xue, H., Zhang, J., Han, X., Yan, S., Bo, S., Liu, S., Yuan, L., Deng, L., Li, G., Wang, Z., 2017a. Neuroprotective Effects of Hydrogen Sulfide Against Early Brain Injury and Secondary Cognitive Deficits Following Subarachnoid Hemorrhage. *Brain Pathol.* 27, 51–63.  
<https://doi.org/10.1111/BPA.12361/FORMAT/PDF>
- Li, T., Wang, L., Hu, Q., Liu, S., Bai, X., Xie, Y., Zhang, T., Bo, S., Gao, X., Wu, S., Li, G., Wang, Z., 2017b. Neuroprotective roles of L-cysteine in attenuating early brain injury and improving synaptic density via the CBS/H<sub>2</sub>S pathway following subarachnoid hemorrhage in rats. *Front. Neurol.* 8, 176. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2017.00176/BIBTEX>
- Li, Y., Park, J.S., Deng, J.H., Bai, Y., 2006. Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* 38, 283–291.  
<https://doi.org/10.1007/S10863-006-9052-Z>
- Liang, Y.F., Zhang, D.D., Yu, X.J., Gao, H.L., Liu, K.L., Qi, J., Li, H.B., Yi, Q.Y., Chen, W.S., Cui, W., Zhu, G.Q., Kang, Y.M., 2017. Hydrogen sulfide in paraventricular nucleus attenuates blood pressure by regulating oxidative stress and inflammatory cytokines in high salt-induced hypertension. *Toxicol. Lett.* 270, 62–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.004>
- Lima, F.D., Souza, M.A., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Martignoni, F.V., Hoffmann, M.S., Figuera, M.R., Royes, L.F.F., Oliveira, M.S., de

- 
- Mello, C.F., 2008. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behav. Brain Res.* 193, 306–310.  
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2008.05.013>
- Loizou, E., Bouamra, O., Dark, P., Martin, B., Lecky, F., 2010. Comparing the systolic blood pressure (SBP) and pulse rate (PR) in injured children with and without traumatic brain injury. *Resuscitation* 81, 418–421.  
<https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2009.12.017>
- Lozano, D., Gonzales-Portillo, G.S., Acosta, S., de la Pena, I., Tajiri, N., Kaneko, Y., Borlongan, C. V., 2015. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: Etiology, Clinical consequences, And therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 97–106.  
<https://doi.org/10.2147/NDT.S65815>
- Luo, P., Li, X., Wu, X., Dai, S., Yang, Y., Xu, Haoxiang, Jing, D., Rao, W., Xu, Hongyu, Gao, X., Fei, Z., Lu, H., 2019. Preso regulates NMDA receptor-mediated excitotoxicity via modulating nitric oxide and calcium responses after traumatic brain injury. *Cell Death Dis.* 2019 107 10, 1–14.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1731-x>
- Lv, L.Q., Hou, L.J., Yu, M.K., Qi, X.Q., Chen, H.R., Chen, J.X., Hu, G.H., Luo, C., Lu, Y.C., 2010. Prognostic influence and magnetic resonance imaging findings in paroxysmal sympathetic hyperactivity after severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 27, 1945–1950.  
<https://doi.org/10.1089/neu.2010.1391>
- Ma, X., Aravind, A., Pfister, B.J., Chandra, N., Haorah, J., 2019. Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity. *Mol. Neurobiol.* 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1454-5>
- Malik, R., Ferguson, A. V., 2016. Hydrogen sulfide depolarizes neurons in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Brain Res.* 1633, 1–9.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.029>
- Maramattom, B. V., Manno, E.M., Fulgham, J.R., Jaffe, A.S., Wijdicks, E.F.M., 2006. Clinical Importance of Cardiac Troponin Release and

- Cardiac Abnormalities in Patients With Supratentorial Cerebral Hemorrhages. *Mayo Clin. Proc.* 81, 192–196.  
<https://doi.org/10.4065/81.2.192>
- Martin, M., Mullenix, P., Rhee, P., Belzberg, H., Demetriades, D., Salim, A., 2005. Troponin increases in the critically injured patient: Mechanical trauma or physiologic stress? *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care* 59, 1086–1091. <https://doi.org/10.1097/01.TA.0000190249.19668.37>
- McCorry, L.K., 2007. Physiology of the autonomic nervous system. *Am. J. Pharm. Educ.* 71. <https://doi.org/10.5688/aj710478>
- McDonald, S.J., Sharkey, J.M., Sun, M., Kaukas, L., Shultz, S.R., Turner, R., Leonard, A.V., Brady, R.D., Corrigan, F., 2020. Beyond the brain: peripheral interactions following traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 1–43. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6885>
- McIntosh, T.K., Head, V.A., Faden, A.I., 1987. Alterations in regional concentrations of endogenous opioids following traumatic brain injury in the cat. *Brain Res.* 425, 225–233. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90505-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90505-1)
- McIntosh, T.K., Vink, R., Noble, L., Yamakami, I., Fernyak, S., Soares, H., Faden, A.L., 1989. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 28, 233–44.  
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90247-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90247-9)
- McMahon, C.G., Kenny, R., Bennett, K., Little, R., Kirkman, E., 2011. Effect of acute traumatic brain injury on baroreflex function. *Shock* 35, 53–58.  
<https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181e687c6>
- Merlini, M., Wanner, D., Nitsch, R.M., 2016. Tau pathology-dependent remodelling of cerebral arteries precedes Alzheimer’s disease-related microvascular cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 2016 1315 131, 737–752. <https://doi.org/10.1007/S00401-016-1560-2>
- Mitchell, C., Davenport, S., 1924. Hydrogen sulphide literature. *Public Heal. Rep.* 39, 1–13.
- Moustafa, A., 2021. Changes in nitric oxide, carbon monoxide, hydrogen

- sulfide and male reproductive hormones in response to chronic restraint stress in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 162, 353–366.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.315>
- Mughal, A., Sackheim, A., Sancho, M., Longden, T., Russell, S., Lockette, W., Nelson, M., Freeman, K., 2021. Impaired capillary-to-arteriolar electrical signaling after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 41, 1313–1327. <https://doi.org/10.1177/0271678X20962594>
- Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S.H., 2009. H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.* 2, ra72–ra72.  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>
- Mustafa, A.K., Sikka, G., Gazi, S.K., Steppan, J., Jung, S.M., Bhunia, A.K., Barodka, V.M., Gazi, F.K., Barrow, R.K., Wang, R., Amzel, L.M., Berkowitz, D.E., Snyder, S.H., 2011. Hydrogen Sulfide as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Sulfhydrates Potassium Channels. *Circ. Res.* 109, 1259–1268.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240242>
- Nagpure, B. V., Bian, J.S., 2015. Brain, learning, and memory: Role of H<sub>2</sub>S in neurodegenerative diseases. *Handb. Exp. Pharmacol.* 230, 193–215.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-18144-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18144-8_10)
- Najafipour, H., Khachaki, A.S., Khaksari, M., Shahouzehi, B., Joukar, S., Poursalehi, H.R., 2014. Traumatic brain injury has not prominent effects on cardiopulmonary indices of rat after 24 hours: Hemodynamic, histopathology, and biochemical evidence. *Iran. Biomed. J.* 18, 225–231.  
<https://doi.org/10.6091/ibj.13222.2014>
- Naylor, D.E., Liu, H., Niquet, J., Wasterlain, C.G., 2013. Rapid surface accumulation of NMDA receptors increases glutamatergic excitation during status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 54, 225–238.  
<https://doi.org/10.1016/J.NBD.2012.12.015>
- Ndode-Ekane, X.E., Santana-gomez, C., Casillas-espinosa, P.M., Ali, I., Brady, R.D., Smith, G., Andrade, P., Immonen, R., Hudson, M.R., Braine,

- E.L., Shultz, S.R., Staba, R.J., Angeles, L., Royal, T., Hospital, M., Hospital, T.A., Road, C., Royal, T., Hospital, M., Angeles, L., 2019. Harmonization of lateral fluid-percussion injury model production and post-injury monitoring in a preclinical multicenter biomarker discovery study on post-traumatic epileptogenesis 151, 7–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2019.01.006>. Harmonization
- Neil-Dwyer, G., Walter, P., Cruickshank, J.M., Doshi, B., O’Gorman, P., 1978. Effect of propranolol and phentolamine on myocardial necrosis after subarachnoid haemorrhage. *Br. Med. J.* 2, 990.  
<https://doi.org/10.1136/BMJ.2.6143.990>
- Nicholls, P., Kim, J.K., 1981. Oxidation of sulphide by cytochrome aa3. *Biochim. Biophys. Acta* 637, 312–20.
- Nissinen, J., Andrade, P., Natunen, T., Hiltunen, M., Malm, T., Kanninen, K., Soares, J.I., Shatillo, O., Sallinen, J., Ndode-Ekane, X.E., Pitkänen, A., 2017. Disease-modifying effect of atipamezole in a model of post-traumatic epilepsy. *Epilepsy Res.* 136, 18–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.07.005>
- Nogueira, J.E., Soriano, R.N., Fernandez, R.A.R., Francescato, H.D.C., Saia, R.S., Coimbra, T.M., Antunes-Rodrigues, J., Branco, L.G.S., 2017. Effect of physical exercise on the febrigenic signaling is modulated by preoptic hydrogen sulfide production. *PLoS One* 12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170468>
- Norris, P.R., Ozdas, A., Cao, H., Williams, A.E., Harrell, F.E., Jenkins, J.M., Morris, J.A., 2006. Cardiac uncoupling and heart rate variability stratify ICU patients by mortality: A study of 2088 trauma patients. *Ann. Surg.* 243, 804–812. <https://doi.org/10.1097/01.SLA.0000219642.92637.FD>
- O’Bryant, A.J., Allred, R.P., Maldonado, M.A., Cormack, L.K., Jones, T.A., 2011. Breeder and batch-dependent variability in the acquisition and performance of a motor skill in adult Long-Evans rats. *Bone* 224, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.028>. Breeder
- Ohlsson, A.-L., Johansson, B.B., 1995. Environment Influences Functional

- Outcome of Cerebral Infarction in Rats. *Stroke* 26, 644–649.  
<https://doi.org/10.1161/01.STR.26.4.644>
- Olson, K.R., DeLeon, E.R., Gao, Y., Hurley, K., Sadauskas, V., Batz, C., Stoy, G.F., 2013. Thiosulfate: A readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, 592–603. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00421.2012>
- Ontiveros, Á., Preciado, A.K., Matute, E., López-Cruz, M., López-Elizalde, R., 2014. Factores pronósticos de recuperación y reinserción laboral en adultos con traumatismo craneoencefálico. *Rev Mex Neuroc* 15, 211–217.
- Østergaard, L., Engedal, T.S., Aamand, R., Mikkelsen, R., Iversen, N.K., Anzabi, M., Næss-Schmidt, E.T., Drasbek, K.R., Bay, V., Blicher, J.U., Tietze, A., Mikkelsen, I.K., Hansen, B., Jespersen, S.N., Juul, N., Sørensen, J.C., Rasmussen, M., 2014. Capillary Transit Time Heterogeneity and Flow-Metabolism Coupling after Traumatic Brain Injury: <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.131> 34, 1585–1598.  
<https://doi.org/10.1038/JCBFM.2014.131>
- Palmer, A.M., Marion, D.W., Botscheller, M.L., Swedlow, P.E., Styren, S.D., DeKosky, S.T., 1993. Traumatic Brain Injury-Induced Excitotoxicity Assessed in a Controlled Cortical Impact Model. *J. Neurochem.* 61, 2015–2024. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1993.TB07437.X>
- Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Jeschke, M.G., Branski, L.K., Herndon, D.N., Wang, R., Szabó, C., 2009. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 21972–7.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0908047106>
- Paul, B.D., Sbodio, J.I., Xu, R., Vandiver, M.S., Cha, J.Y., Snowman, A.M., Snyder, S.H., 2014. Cystathionine  $\gamma$ -lyase deficiency mediates neurodegeneration in Huntington's disease. *Nature* 509, 96–100.  
<https://doi.org/10.1038/nature13136>
- Paul, B.D., Snyder, S.H., 2015a. H<sub>2</sub>S: A Novel Gasotransmitter that Signals

- by Sulfhydration. *Trends Biochem. Sci.* 40, 687–700.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.08.007>
- Paul, B.D., Snyder, S.H., 2015b. Modes of Physiologic H<sub>2</sub>S Signaling in the Brain and Peripheral Tissues. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 411–423.  
<https://doi.org/10.1089/ars.2014.5917>
- Penfield, W., 1929. Diencephalic autonomic epilepsy. *Arch. Neurol. Psychiatry* 22, 358–374.  
<https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1929.02220020174010>
- Pierce, J.E.S., Smith, D.H., Trojanowski, J.Q., McIntosh, T.K., 1998. Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience* 87, 359–369. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00142-0](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00142-0)
- Pomierny, B., Krzyżanowska, W., Jurczyk, J., Skórkowska, A., Strach, B., Szafarz, M., Przejczowska-Pomierny, K., Torregrossa, R., Whiteman, M., Marcinkowska, M., Pera, J., Budziszewska, B., 2021. The Slow-Releasing and Mitochondria-Targeted Hydrogen Sulfide (H<sub>2</sub>S) Delivery Molecule AP39 Induces Brain Tolerance to Ischemia. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7816. <https://doi.org/10.3390/IJMS22157816>
- Prathep, S., Sharma, D., Hallman, M., Joffe, A., Krishnamoorthy, V., Mackensen, B.G., Vavilala, M.S., 2014. Preliminary Report on Cardiac Dysfunction after Isolated Traumatic Brain Injury. *Crit Care Med* 42, 1–7.
- Prichep, L.S., Naunheim, R., Bazarian, J., Mould, W.A., Hanley, D., 2015. Identification of Hematomas in Mild Traumatic Brain Injury Using an Index of Quantitative Brain Electrical Activity. *J. Neurotrauma* 32, 17. <https://doi.org/10.1089/NEU.2014.3365>
- Prins, M., Greco, T., Alexander, D., Giza, C.C., 2013. The pathophysiology of traumatic brain injury at a glance. *Dis. Model. Mech.* 6, 1307–1315. <https://doi.org/10.1242/DMM.011585>
- Purkayastha, S., Stokes, M., Bell, K.R., 2019. Autonomic nervous system dysfunction in mild traumatic brain injury: a review of related

- 
- pathophysiology and symptoms. *Brain Inj.* 33, 1129–1136.  
<https://doi.org/10.1080/02699052.2019.1631488>
- Reichenbach, D., Benditt, E., 1970. Catecholamines and cardiomyopathy. *Hum. Pathol.* 1, 125–150.
- Renga, B., Cipriani, S., Carino, A., Simonetti, M., Zampella, A., Fiorucci, S., 2015. Reversal of endothelial dysfunction by gpbar1 agonism in portal hypertension involves a AKT/FOXO1 dependent regulation of H2S generation and endothelin-1. *PLoS One* 10.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141082>
- Roa-Coria, J.E., Pineda-Farias, J.B., Barragán-Iglesias, P., Quiñonez-Bastidas, G.N., Zúñiga-Romero, Á., Huerta-Cruz, J.C., Reyes-García, J.G., Flores-Murrieta, F.J., Granados-Soto, V., Rocha-González, H.I., 2019. Possible involvement of peripheral TRP channels in the hydrogen sulfide-induced hyperalgesia in diabetic rats. *BMC Neurosci.* 20, 1–17.  
<https://doi.org/10.1186/s12868-018-0483-3>
- Robertson, C.S., Clifton, G.L., Grossman, R.G., 1984. Oxygen Utilization and Cardiovascular Function in Head-injured Patients. *Neurosurgery* 15, 307–314. <https://doi.org/10.1227/00006123-198409000-00003>
- Roe, S.Y., Rothwell, N.J., 2009. Whole Body Metabolic Responses to Brain Trauma in the Rat. *J. Neurotrauma* 14, 399–408.  
<https://doi.org/10.1089/NEU.1997.14.399>
- Rosner, M.J., Newsome, H.H., Becker, D.P., 1984. Mechanical brain injury the sympathoadrenal response. *J. Neurosurg.* 61, 76–86.  
<https://doi.org/10.3171/jns.1984.61.1.0076>
- Rubiano, A.M., Carney, N., Chesnut, R., Puyana, J.C., 2015. Global neurotrauma research challenges and opportunities. *Nat.* 2015 5277578 527, S193–S197. <https://doi.org/10.1038/nature16035>
- Sabino, J.P.J., Traslaviña, G.A.A., Branco, L.G.S., 2016. Role of central hydrogen sulfide on ventilatory and cardiovascular responses to hypoxia in spontaneous hypertensive rats. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 231, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2016.05.016>

- 
- Sackheim, A.M., Villalba, N., Sancho, M., Harraz, O.F., Bonev, A.D., D'Alessandro, A., Nemkov, T., Nelson, M.T., Freeman, K., 2021. Traumatic Brain Injury Impairs Systemic Vascular Function Through Disruption of Inward-Rectifier Potassium Channels. *Function*.  
<https://doi.org/10.1093/function/zqab018>
- Salim, A., Hadjizacharia, P., Brown, C., Inaba, K., Teixeira, P.G.R., Chan, L., Rhee, P., Demetriades, D., 2008. Significance of troponin elevation after severe traumatic brain injury. *J. Trauma - Inj. Infect. Crit. Care* 64, 46–52.  
<https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31815eb15a>
- Salvi, A., Bankhele, P., Jamil, J.M., Kulkarni-Chitnis, M., Njie-Mbye, Y.F., Ohia, S.E., Opere, C.A., 2016. Pharmacological Actions of Hydrogen Sulfide Donors on Sympathetic Neurotransmission in the Bovine Anterior Uvea, *In Vitro*. *Neurochem. Res.* 41, 1020–8.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-015-1784-x>
- Santiago-Castañeda, C., Segovia-Oropeza, M., Concha, L., Orozco-Suárez, S.A., Rocha, L., 2020. Propylparaben Reduces the Long-Term Consequences in Hippocampus Induced by Traumatic Brain Injury in Rats: Its Implications as Therapeutic Strategy to Prevent Neurodegenerative Diseases. *J. Alzheimer's Dis.* 1–12.  
<https://doi.org/10.3233/jad-200914>
- Sarukhani, M., Haghdoost-Yazdi, H., Sarbazi Golezari, A., Babayan-Tazehkand, A., Dargahi, T., Rastgoo, N., 2018. Evaluation of the antiparkinsonism and neuroprotective effects of hydrogen sulfide in acute 6-hydroxydopamine-induced animal model of Parkinson's disease: behavioral, histological and biochemical studies. *Neurol. Res.* 40, 525–533. <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1390903>
- Schreibelt, G., Kooij, G., Reijerkerk, A., Doorn, R. van, Gringhuis, S.I., Pol, S. van der, Weksler, B.B., Romero, I.A., Couraud, P.-O., Piontek, J., Blasig, I.E., Dijkstra, C.D., Ronken, E., Vries, H.E. de, 2007. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB J.* 21, 3666–3676.

- 
- <https://doi.org/10.1096/FJ.07-8329COM>
- Searcy, D., Lee, S., 1998. Sulfur reduction by human erythrocytes. *J. Exp. Zool.* 282, 310–322. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19981015\)282:3<310::aid-jez4>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19981015)282:3<310::aid-jez4>3.0.co;2-p).
- Segovia-Oropeza, M., Santiago-Castañeda, C., Orozco-Suárez, S.A., Concha, L., Rocha, L., 2020. Sodium Cromoglycate Decreases Sensorimotor Impairment and Hippocampal Alterations Induced by Severe Traumatic Brain Injury in Rats. *J. Neurotrauma* 37, 2595–2603. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6975>
- Sell, S.L., Johnson, K., Dewitt, D.S., Prough, D.S., 2017. Persistent Behavioral Deficits in Rats after Parasagittal Fluid Percussion Injury. *J. Neurotrauma* 34, 1086–1096. <https://doi.org/10.1089/neu.2016.4616>
- Serri, K., El Rayes, M., Giraldeau, G., Williamson, D., Bernard, F., 2016. Traumatic brain injury is not associated with significant myocardial dysfunction: An observational pilot study. *Scand. J. Trauma. Resusc. Emerg. Med.* 24, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13049-016-0217-4>
- Sha, L., Linden, D.R., Farrugia, G., Szurszewski, J.H., 2013. Hydrogen sulfide selectively potentiates central preganglionic fast nicotinic synaptic input in mouse superior mesenteric ganglion. *J. Neurosci.* 33, 12638–46. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4429-12.2013>
- Shan, H., Qiu, J., Chang, P., Chu, Y., Gao, C., Wang, H., Chen, G., Luo, C., Wang, T., Chen, X., Zhang, M., Tao, L., 2019. Exogenous Hydrogen Sulfide Offers Neuroprotection on Intracerebral Hemorrhage Injury Through Modulating Endogenous H<sub>2</sub>S Metabolism in Mice. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00349>
- Shapira, Y., Setton, D., Artru, A.A., Shohami, E., 1993. Blood-brain barrier permeability, cerebral edema, and neurologic function after closed head injury in rats. *Anesth. Analg.* 77, 141–148. <https://doi.org/10.1213/00000539-199307000-00028>
- Shen, X., Carlström, M., Borniquel, S., Jädert, C., Kevil, C.G., Lundberg, J.O., 2013. Microbial regulation of host hydrogen sulfide bioavailability and

- metabolism. *Free Radic. Biol. Med.* 60, 195–200.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.024>
- Shi, L., Lei, J., Xu, H., Zheng, J., Wang, Y., Peng, Y., Yu, J., Zhang, J., Shi, L., Lei, J., Xu, H., Zheng, J., Wang, Y., Peng, Y., Yu, J., Zhang, J., 2017. Hydrogen sulfide ameliorates subarachnoid hemorrhage-induced neuronal apoptosis via the ROS-MST1 pathway. *Oncotarget* 8, 73547–73558. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.20569>
- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., Kimura, H., 2009. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Hydrogen Sulfide and Bound Sulfane Sulfur in the Brain. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 703–714. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2253>
- Shui, M., Liu, X., Zhu, Y., Wang, Y., 2016. Exogenous hydrogen sulfide attenuates cerebral ischemia–reperfusion injury by inhibiting autophagy in mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94, 1187–1192.  
<https://doi.org/10.1139/CJPP-2016-0100>
- Simard, J.C., Cesaro, A., Chapeton-Montes, J., Tardif, M., Antoine, F., Girard, D., Tessier, P.A., 2013. S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF- $\kappa$ B(1.). *PLoS One* 8.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0072138>
- Simões, A.P., Silva, C.G., Marques, J.M., Pochmann, D., Porciúncula, L.O., Ferreira, S., Oses, J.P., Beleza, R.O., Real, J.I., Köfalvi, A., Bahr, B.A., Lerma, J., Cunha, R.A., Rodrigues, R.J., 2018. Glutamate-induced and NMDA receptor-mediated neurodegeneration entails P2Y1 receptor activation. *Cell Death Dis.* 9. <https://doi.org/10.1038/S41419-018-0351-1>
- Smith, S., Andrus, P., Zhang, J., Hall, E., 1994. Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. *J. Neurotrauma* 11, 393–404. <https://doi.org/10.1089/NEU.1994.11.393>
- Soblosky, J.S., Matthews, M.A., Davidson, J.F., Tabor, S.L., Carey, M.E., 1996. Traumatic brain injury of the forelimb and hindlimb sensorimotor

- areas in the rat: Physiological, histological and behavioral correlates. *Behav. Brain Res.* 79, 79–92. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(95\)00264-2](https://doi.org/10.1016/0166-4328(95)00264-2)
- Srihagulang, C., Vongsfak, J., Vaniyapong, T., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S.C., 2022. Potential roles of vagus nerve stimulation on traumatic brain injury: Evidence from in vivo and clinical studies. *Exp. Neurol.* 347. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2021.113887>
- Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., Riddle, S.R., Frid, M.G., 2013. The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 23–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>
- Streeter, E., Al-Magableh, M., Hart, J.L., Badoer, E., 2011. Hydrogen sulfide in the RVLM and PVN has no effect on cardiovascular regulation. *Front. Physiol.* 2 SEP, 55. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2011.00055/BIBTEX>
- Sun, G.C., Ho, W.Y., Chen, B.R., Cheng, P.W., Cheng, W.H., Hsu, M.C., Yeh, T.C., Hsiao, M., Lu, P.J., Tseng, C.J., 2015. GPCR dimerization in brainstem nuclei contributes to the development of hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2507–2518. <https://doi.org/10.1111/bph.13074>
- Sun, H.Z., Yu, K.H., Ai, H.B., 2015. Role of hydrogen sulfide within the dorsal motor nucleus of the vagus in the control of gastric function in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* 27, 618–626. <https://doi.org/10.1111/NMO.12530>
- Sun, J., Li, X., Gu, X., Du, H., Zhang, G., Wu, J., Wang, F., 2021. Neuroprotective effect of hydrogen sulfide against glutamate-induced oxidative stress is mediated via the p53/glutaminase 2 pathway after traumatic brain injury. *Aging (Albany. NY)*. 13, 7180. <https://doi.org/10.18632/aging.202575>
- Szabo, C., 2017. A timeline of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem. Pharmacol.* 149, 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.010>

- 
- Szarka, N., Pabbidi, M.R., Amrein, K., Czeiter, E., Berta, G., Pohoczky, K., Helyes, Z., Ungvari, Z., Koller, A., Buki, A., Toth, P., 2018. Traumatic Brain Injury Impairs Myogenic Constriction of Cerebral Arteries: Role of Mitochondria-Derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and TRPV4-Dependent Activation of BKca Channels. *J. Neurotrauma* 35, 930–939.  
<https://doi.org/10.1089/NEU.2017.5056>
- Taniguchi, T., Kimura, T., 1974. Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the formation of the iron-sulfur chromophore of adrenal ferredoxin. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.* 364, 284–295.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2744\(74\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0005-2744(74)90014-X)
- Thorley, R.R., Wertsch, J.J., Klingbeil, G.E., 2001. Acute hypothalamic instability in traumatic brain injury: A case report. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 82, 246–249. <https://doi.org/10.1053/apmr.2001.18698>
- Tian, J., Yang, Lei, Wang, P., Yang, Lijun, Fan, Z., 2020. Exogenous CGRP Regulates Apoptosis and Autophagy to Alleviate Traumatic Brain Injury Through Akt/mTOR Signalling Pathway. *Neurochem. Res.* 45, 2926–2938. <https://doi.org/10.1007/S11064-020-03141-9>
- Tortora, G., Derrickson, B., 2013. *Principios de Anatomía y Fisiología*, Panamericana.
- Tümer, N., Svetlov, S., Whidden, M., Kirichenko, N., Prima, V., Erdos, B., Sherman, A., Kobeissy, F., Yeziarski, R., Scarpace, P.J., Vierck, C., Wang, K.K.W., 2013. Overpressure blast-wave induced brain injury elevates oxidative stress in the hypothalamus and catecholamine biosynthesis in the rat adrenal medulla. *Neurosci. Lett.* 544, 62–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.03.042>
- Ubuka, T., Umemura, S., Yuasa, S., Kinuta, M., Watanabe, K., 1978. Purification and characterization of mitochondrial cysteine aminotransferase from rat liver. *Physiol. Chem. Phys.* 10, 483–500.
- Ufnal, M., Sikora, M., Dudek, M., 2008. Exogenous hydrogen sulfide produces hemodynamic effects by triggering central neuroregulatory mechanisms. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 68, 382–388.

- 
- Umemoto, Y., Patel, A., Huynh, T., Chitravanshi, V.C., 2019. Wogonin attenuates the deleterious effects of traumatic brain injury in anesthetized Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.* 848, 121–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.01.035>
- Utagawa, A., Truettner, J.S., Dietrich, W.D., Bramlett, H.M., 2008. Systemic inflammation exacerbates behavioral and histopathological consequences of isolated traumatic brain injury in rats. *Exp. Neurol.* 211, 283–291. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2008.02.001>
- Van Landeghem, F.K.H., Weiss, T., Oehmichen, M., Von Deimling, A., 2006. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 23, 1518–1528.  
<https://doi.org/10.1089/NEU.2006.23.1518>
- Vandini, E., Ottani, A., Zaffe, D., Calevro, A., Canalini, F., Cavallini, G.M., Rossi, R., Guarini, S., Giuliani, D., 2019. Mechanisms of hydrogen sulfide against the progression of severe Alzheimer’s disease in transgenic mice at different ages. *Pharmacology* 103, 93–100.  
<https://doi.org/10.1159/000494113>
- Vavilala, M., Tontisirin, N., Udomphorn, Y., Armstead, W., Zimmerman, J., Chesnut, R., Lam, A., 2008. Hemispheric differences in cerebral autoregulation in children with moderate and severe traumatic brain injury. *Neurocrit. Care* 9, 45–54. <https://doi.org/10.1007/S12028-007-9036-9>
- Villalba, N., Sackheim, A.M., Nunez, I.A., Hill-Eubanks, D.C., Nelson, M.T., Wellman, G.C., Freeman, K., 2017. Traumatic Brain injury causes endothelial dysfunction in the systemic microcirculation through arginase-1-dependent uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *J. Neurotrauma* 34, 192–203. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4340>
- Wang, R., 2002. Two’s company, three’s a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16, 1792–1798.  
<https://doi.org/10.1096/fj.02-0211hyp>
- Wang, R., 2003. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid.*

- Redox Signal. 5.
- Wang, R., 2014. Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem. Sci.* 39, 227–32. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.003>
- Wang, R., Hösl, K.M., Ammon, F., Markus, J., Koehn, J., Roy, S., Liu, M., de Rojas Leal, C., Muresanu, D., Flanagan, S.R., Hiltz, M.J., 2018. Eyeball pressure stimulation induces subtle sympathetic activation in patients with a history of moderate or severe traumatic brain injury. *Clin. Neurophysiol.* 129, 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2018.03.011>
- Wang, X., Gao, X., Michalski, S., Zhao, S., Chen, J., 2016. Traumatic Brain Injury Severity Affects Neurogenesis in Adult Mouse Hippocampus. *J. Neurotrauma* 33, 721–733. <https://doi.org/10.1089/neu.2015.4097>
- Warenycia, M.W., Goodwin, L.R., Benishin, C.G., Reiffenstein, R.J., Francom, D.M., Taylor, J.D., 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, 973–981. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90288-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90288-8)
- Wei, X., Zhang, B., Cheng, L., Chi, M., Deng, L., Pan, H., Yao, X., Wang, G., 2015. Hydrogen sulfide induces neuroprotection against experimental stroke in rats by down-regulation of AQP4 via activating PKC. *Brain Res.* 1622, 292–299. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2015.07.001>
- Wen, J.-Y., Wang, M., Li, Y.-N., Jiang, H.-H., Sun, X.-J., Chen, Z.-W., 2018. Vascular Protection of Hydrogen Sulfide on Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Front. Neurol.* 0, 779. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2018.00779>
- Westfall, T., Westfall, D., 2022. Neurotransmisión: sistemas nerviosos autónomo y motor somático, in: Goodman, L., Brunton, L., Chabner, B., Knollmann, B. (Eds.), *Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, p. 2084.
- White, B.J.O., Smith, P.A., 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, 785–93. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02187.x>
- Winchell, R., Hoyt, D., 1997. Analysis of heart-rate variability: a noninvasive predictor of death and poor outcome in patients with severe head injury. *J. Trauma* 43, 927–933. <https://doi.org/10.1097/00005373-199712000-00010>
- Witcher, K.G., Bray, C.E., Chunchai, T., Zhao, F., O’Neil, S.M., Gordillo, A.J., Campbell, W.A., McKim, D.B., Liu, X., Dziabis, J.E., Quan, N., Eiferman, D.S., Fischer, A.J., Kokiko-Cochran, O.N., Askwith, C., Godbout, J.P., 2021. Traumatic Brain Injury Causes Chronic Cortical Inflammation and Neuronal Dysfunction Mediated by Microglia. *J. Neurosci.* 41, 1597–1616. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2469-20.2020>
- Wu, J., Vogel, T., Gao, X., Lin, B., Kulwin, C., Chen, J., 2018. Neuroprotective effect of dexmedetomidine in a murine model of traumatic brain injury. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23003-3>
- Xiao, L., Wu, Y., Wang, R., Liu, Y., Wang, F., He, R., 2007. Hydrogen sulfide facilitates carotid sinus baroreceptor activity in anesthetized male rats. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 120, 1343–1347.
- Xu, J., Rasmussen, I., Lagopoulos, J., Håberg, A., 2007. Diffuse axonal injury in severe traumatic brain injury visualized using high-resolution diffusion tensor imaging. *J. Neurotrauma* 24, 753–765. <https://doi.org/10.1089/NEU.2006.0208>
- Xu, Kebin, Wu, Fangfang, Xu, Ke, Li, Z., Wei, X., Lu, Q., Jiang, T., Wu, Fenzan, Xu, X., Xiao, J., Chen, D., Zhang, H., 2018. NaHS restores mitochondrial function and inhibits autophagy by activating the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway to improve functional recovery after traumatic brain injury. *Chem. Biol. Interact.* 286, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.028>
- Yang, G., Pei, Y., Teng, H., Cao, Q., Wang, R., 2011. Specificity protein-1 as

- a critical regulator of human cystathionine  $\gamma$ -lyase in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 286, 26450–26460.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266643>
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A.K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S.H., Wang, R., 2008. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 322, 587–90.  
<https://doi.org/10.1126/science.1162667>
- Yang, J., Minkler, P., Grove, D., Wang, R., Willard, B., Dweik, R., Hine, C., 2019. Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B 6. *Commun. Biol.* 2.  
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0431-5>
- Yellinek, S., Cohen, A., Merkin, V., Shelef, I., Benifla, M., 2016. Clinical significance of skull base fracture in patients after traumatic brain injury. *J. Clin. Neurosci.* 25, 111–115.  
<https://doi.org/10.1016/J.JOCN.2015.10.012>
- Yong, Q.C., Pan, T.-T., Hu, L.-F., Bian, J.-S., 2008. Negative regulation of  $\beta$ -adrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44, 701–710. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.01.007>
- Yu, H., Xu, H., Liu, X., Zhang, N., He, A., Yu, J., Lu, N., 2015. Superoxide mediates depressive effects induced by hydrogen sulfide in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/927686>
- Yu, W., Liao, Y., Huang, Y., Chen, S.Y., Sun, Y., Sun, C., Wu, Y., Tang, C., Du, J., Jin, H., 2017. Endogenous hydrogen sulfide enhances carotid sinus baroreceptor sensitivity by activating the transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) channel. *J. Am. Heart Assoc.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004971>
- Yu, X., Cui, L., Wu, K., Zheng, X., Cayabyab, F., ZW, C., Tang, C., 2014. Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clin. Chim. Acta* 437, 78–87. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2014.07.012>

- Zhang, J.-Y., Ding, Y.-P., Wang, Z., Kong, Y., Gao, R., Chen, G., 2017. Hydrogen sulfide therapy in brain diseases: from bench to bedside. *Med. Gas Res.* 7, 113–119. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.208517>
- Zhang, J., Shi, C., Wang, H., Gao, C., Chang, P., Chen, X., Shan, H., Zhang, M., Tao, L., 2019. Hydrogen sulfide protects against cell damage through modulation of PI3K/Akt/Nrf2 signaling. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 117, 105636. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105636>
- Zhang, J., Zhang, S., Shan, H., Zhang, M., 2020. Biologic Effect of Hydrogen Sulfide and Its Role in Traumatic Brain Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/7301615>
- Zhang, M., Shan, H., Chang, P., Ma, L., Chu, Y., Shen, X., Wu, Q., Wang, Z., Luo, C., Wang, T., Chen, X., Tao, L., 2016. Upregulation of 3-MST Relates to Neuronal Autophagy After Traumatic Brain Injury in Mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 37, 291–302. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0369-9>
- Zhang, M., Shan, H., Chang, P., Wang, T., Dong, W., Chen, X., Tao, L., 2014. Hydrogen sulfide offers neuroprotection on traumatic brain injury in parallel with reduced apoptosis and autophagy in mice. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087241>
- Zhang, M., Shan, H., Wang, T., Liu, W., Wang, Y., Wang, L., Zhang, L., Chang, P., Dong, W., Chen, X., Tao, L., 2013. Dynamic change of hydrogen sulfide after traumatic brain injury and its effect in mice. *Neurochem. Res.* 38, 714–725. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-0969-4>
- Zhang, M., Wu, X., Xu, Y., He, M., Yang, J., Li, J., Li, Y., Ao, G., Cheng, J., Jia, J., 2017. The cystathionine  $\beta$ -synthase/hydrogen sulfide pathway contributes to microglia-mediated neuroinflammation following cerebral ischemia. *Brain. Behav. Immun.* 66, 332–346. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2017.07.156>
- Zhao, Q., Yan, T., Li, L., Chopp, M., Venkat, P., Qian, Y., Li, R., Wu, R., Li, W., Lu, M., Zhang, T., Chen, J., 2019. Immune Response Mediates Cardiac Dysfunction after Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 36,

- 619–629. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5766>
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R., 2001. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* 20, 6008–16. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>
- Zhong, G.Z., Chen, F.R., Cheng, Y.Q., Tang, C.S., Du, J.B., 2003. The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J. Hypertens.* 21, 1879–1885. <https://doi.org/10.1097/00004872-200310000-00015>
- Zhou, J., Lv, X.H., Fan, J.J., Dang, L.Y., Dong, K., Gao, B., Song, A.Q., Wu, W.N., 2018. GYY4137 promotes mice feeding behavior via arcuate nucleus sulfur-sulphydrylation and AMPK activation. *Front. Pharmacol.* 9, 966. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00966/BIBTEX>
- Ziolkowski, N., Grover, A.K., 2010. Functional linkage as a direction for studies in oxidative stress: A-adrenergic receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 220–232. <https://doi.org/10.1139/Y10-013>
- Zygun, D.A., Kortbeek, J.B., Fick, G.H., Laupland, K.B., Doig, C.J., 2005. Non-neurologic organ dysfunction in severe traumatic brain injury. *Crit. Care Med.* 33, 654–660. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000155911.01844.54>

## 12. ANEXOS

### 12.1. Artículos derivados de este proyecto

**12.1.1. Huerta de la Cruz, S.,** Rocha, L., Santiago-Castañeda, C., Sánchez-López, A., Pinedo-Rodríguez, A.D., Medina-Terol, G.J., Centurión, D. (2022). Hydrogen Sulfide Subchronic Treatment Improves Hypertension Induced by Traumatic Brain Injury in Rats through Vasopressor Sympathetic Outflow Inhibition. *J. Neurotrauma* 15, 1–15.

**12.1.2. Huerta de la Cruz, S.,** Rodríguez-Palma E.J., Santiago-Castañeda, C.L., Beltrán-Ornelas J.H., Sánchez-López, A., Rocha, L., Centurión, D. (2022). “Exogenous hydrogen sulfide restores CSE and CBS but no 3-MST protein expression in the hypothalamus and brainstem after severe traumatic brain injury,” *Metab. Brain Dis.* 37(5), 1–12.

### 12.2. Artículos derivados de otros proyectos

**12.2.1. Gomez, C.B., Huerta de la Cruz, S.,** Medina-Terol, G.J., Beltran-Ornelas, J.H., Sanchez-Lopez, A., Silva-Velasco, D.L., and Centurion, D. (2019). Chronic administration of NaHS and L-Cysteine restores cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 863, 172707.

**12.2.2. Sancho, M., Klug, N.K., Mughal, A., Koide, M., Huerta de la Cruz, S.,** Heppner, T.J., Bonev, A.D., Hill-Eubanks, D., Nelson, M.T. (2022). Adenosine signaling activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in endothelial cells and pericytes in CNS capillaries. *Sci Signal.* 15(727):eabl5405.

### **12.3. Congresos**

- 12.3.1.** LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Querétaro, México. 2019. Presentación oral.
- 12.3.2.** XLII Reunión Anual del Capítulo Mexicano de la Liga Internacional Contra la Epilepsia. Mazatlán, Sinaloa, México. 2019. Asistente.
- 12.3.3.** Neuroscience 2019, the 49th the Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Chicago, IL, USA.
- 12.3.4.** IV Congreso de Neurobiología de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Oaxaca, México. Presentación de poster.

### **12.4. Actividades académicas**

- 12.4.1.** Segundo Encuentro Internacional Virtual en Neurociencias del Consejo Mexicano de Neurociencias. 40 h. 2020.
- 12.4.2.** Curso “Estadística Básica en R” por el Departamento de Educación Continua de la Universidad Veracruzana. 40 h. 2021.
- 12.4.3.** Estancia académica y de investigación en el Laboratorio del Dr. Kalev Freeman del Department of Surgery en la University of Vermont. 2021.
- 12.4.4.** Instructor del Curso-Taller “El Sistema cardiovascular y sus alteraciones desde un enfoque farmacológico” dirigido a los alumnos del Programa Académico de Maestría en Ciencias Biomédicas (SNP 5101) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 2022.
- 12.4.5.** Instructor del Curso-Taller “Generalidades de farmacodinamia experimental” dirigido a los alumnos del Programa Académico de Maestría en Ciencias Biomédicas (SNP 5101) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. 2022.

## **12.5. Actividades de retribución social**

- 12.5.1.** Comité Organizador de la Semana del Cerebro del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav Sede Sur. 2019.
- 12.5.2.** Participación en el proyecto “COVID-19 and Indigenous Languages” (project ID: COVSUP03) con información sobre el COVID-19 bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta (Cinvestav) y el Dr. Juan Francisco Esteva Martínez (University of California, Berkely) con apoyo de la UCMX. 2021.
- 12.5.3.** Comité Organizador de la Semana del Cerebro del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav Sede Sur. 2022.
- 12.5.4.** Participación en el Biocinves 2022 con la plática titulada “El traumatismo craneoencefálico y su relación con el sistema cardiovascular”.

## ORIGINAL ARTICLE

## TRANSLATIONAL THERAPEUTICS

## Hydrogen Sulfide Subchronic Treatment Improves Hypertension Induced by Traumatic Brain Injury in Rats through Vasopressor Sympathetic Outflow Inhibition

Saúl Huerta de la Cruz, Luisa Rocha, Cindy Santiago-Castañeda, Araceli Sánchez-López, Alma D. Pinedo-Rodríguez, Grecia J. Medina-Terol, and David Centurión\*

### Abstract

Traumatic brain injury (TBI) represents a critical public health problem around the world. To date, there are no accurate therapeutic approaches for the management of cardiovascular impairments induced by TBI. In this regard, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), a novel gasotransmitter, has been proposed as a neuro- and cardioprotective molecule. This study was designed to determine the effect of subchronic management with sodium hydrosulfide (NaHS) on hemodynamic, vasopressor sympathetic outflow and sensorimotor alterations produced by TBI. Animals underwent a lateral fluid percussion injury, and changes in hemodynamic variables were measured by pletismographic methods. In addition, vasopressor sympathetic outflow was assessed by a pithed rat model. Last, sensorimotor impairments were evaluated by neuroscore test and beam-walking test. At seven, 14, 21, and 28 days after moderate-severe TBI, the animals showed: (1) a decrease on sensorimotor function in the neuroscore test and beam-walking test; (2) an increase in heart rate, systolic, diastolic, and mean blood pressure; (3) progressive sympathetic hyperactivity; and (4) a decrease in vasopressor responses induced by noradrenaline ( $\alpha_{1/2}$ -adrenoceptors agonist) and UK 14,304 (selective  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist). Interestingly, intraperitoneal daily injections of NaHS, an H<sub>2</sub>S donor (3.1 and 5.6 mg/kg), during seven days after TBI prevented the development of the impairments in hemodynamic variables, which were similar to those obtained in sham animals. Moreover, NaHS treatment prevented the sympathetic hyperactivity and decreased noradrenaline-induced vasopressor responses. No effects on sensorimotor dysfunction were observed, however. Taken together, our results suggest that H<sub>2</sub>S ameliorates the hemodynamic and sympathetic system impairments observed after TBI.

**Keywords:** cardiovascular; hydrogen sulfide; sensorimotor function; sympathetic system; traumatic brain injury

### Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is considered an increasing critical public health problem around the world.<sup>1</sup> In brief, this condition is defined as a disruption in the brain caused by an external physical force and represents one of the most common causes of permanent or temporal disability.<sup>2</sup> It is well known that TBI acutely induces skull fractures, hematoma, excitotoxicity, edema, and diffuse axonal injury.<sup>3</sup> Moreover, TBI induces long-term consequences such as hyperexcitability,<sup>4</sup> inflammation,<sup>5</sup> mitochondrial dysfunction,<sup>6</sup> sensorimotor dysfunction,<sup>7</sup> and autonomic dysfunction.<sup>8</sup> In this regard, it has been reported that moderate TBI induces: (1) impaired baroreceptor reflex,<sup>9</sup> (2) an increase in systolic blood pressure (SBP),<sup>10</sup> and (3) sympathetic alteration.<sup>11</sup>

Because the central nervous system highly regulates the cardiovascular system, it has been proposed that cardiovascular impairments could be partially mediated by the damage in central structures such as rostroventrolateral medulla (RVLM), caudal-ventrolateral medulla (CVLM), paraventricular nucleus (PVN), and solitary tract nucleus (NTS).<sup>8,12</sup> Despite the above lines of evidence, unfortunately, hemodynamic and vasopressor sympathetic impairments after moderate-severe TBI have not been explored

Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Coapa, Mexico City, Mexico.

\*Address correspondence to: David Centurión, PhD, Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Coapa, Czada. de los Tenorios 235, Col. Granjas-Coapa, Del. Tlalpan, C.P. 14330, México D.F., México. E-mail: dcenturi@cinvestav.mx

comprehensively. Further, it has been suggested that cardiovascular impairments represent an important influence on the outcome of patients.<sup>13</sup>

Because of this relevance, it is essential to look for new molecules that aid with the management of cardiovascular consequences after TBI. In this regard, it has been described that hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S), a novel gas-transmitter synthesized endogenously by cystathionine- $\gamma$ -lyase (CSE), cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST), exerts physiological effect such as: (1) cardioprotection,<sup>14</sup> (2) neuroprotection,<sup>15</sup> and (3) regulation of sympathetic outflow.<sup>16–18</sup> Moreover, it has been proposed that H<sub>2</sub>S could have a potential therapeutic effect in several neurodegenerative diseases including TBI.<sup>19,20</sup>

In this respect, TBI induces a decrease in H<sub>2</sub>S plasmatic levels as well as dynamic changes in messenger ribonucleic acid (mRNA) and protein expression of H<sub>2</sub>S-synthesizing enzyme.<sup>6,21,22</sup> Moreover, acute H<sub>2</sub>S donors administration, sodium hydrosulfide (NaHS) and ATB-346, in animal models of TBI induces short-term effects such as: (1) decrease in edema,<sup>6</sup> (2) suppression of neuronal cell death,<sup>23</sup> and (3) improved spatial memory.<sup>24</sup> Further, pre-treatment with NaHS: (1) maintains blood–brain barrier (BBB) integrity,<sup>6</sup> (2) protects against apoptosis,<sup>25</sup> and (3) promotes remyelination and axonal repair.<sup>26</sup> The effect of NaHS on hemodynamic and vasopressor sympathetic impairments after moderate-severe TBI remains elusive, however.

Thus, this study was designed to determine the potential effect of subchronic treatment with NaHS on cardiovascular and sympathetic system alterations, as well as sensorimotor dysfunction, produced by TBI. These data could shed further light on the management of TBI consequences in the cardiovascular system. Therefore, we hypothesized that the subchronic treatment with NaHS could prevent the development of cardiovascular and sympathetic system alterations observed after a TBI.

## Methods

### Animals

Eight-week old male Wistar rats (240–260 g) were housed individually in acrylic cages and maintained under controlled temperature and humidity conditions (22° ± 1°C, 50% humidity, and 12/12 h light-dark cycle) and provided with tap water and food (LabDiet® 5008) *ad libitum*. All animal procedures and the protocols of the present study were performed with the approval of the Institutional Ethics Committee (Cicual-Cinvestav) following the established regulations by the Mexican Official Norm for the Use and Welfare of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999) and following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in the United States.<sup>27</sup>

### Experimental groups

The experiments of the present study were designed to determine the potential effect of NaHS subchronic treatment (seven days) to prevent the development of sensorimotor, hemodynamic, and vasopressor sympathetic impairments observed after a TBI induced by lateral fluid percussion injury (LFPI) (Fig. 1). For that purpose, the following experiments were performed:

(a) TBI + NaHS group ( $n=14$ ). Rats underwent a TBI. At 24 h after trauma, rats were treated with intraperitoneal (IP) NaHS, 3.1 or 5.6 mg/kg ( $n=7$ , each). This treatment was repeated daily during seven days. Similar NaHS doses were reported previously with beneficial effects in sympathetic impairments<sup>28</sup> and TBI-induced neurological consequences.<sup>6,24</sup> Hemodynamic variables (heart rate [HR], SBP, diastolic blood pressure [DBP], and mean blood pressure [MBP]), were evaluated weekly (day seven, 14, 21, and 28). Sensorimotor activity was assessed one day before and two, seven, 14, 21, and 28 days after TBI. At the end of the experimental procedure (day 28 after TBI), animals were pithed to analyze vasopressor sympathetic activity.

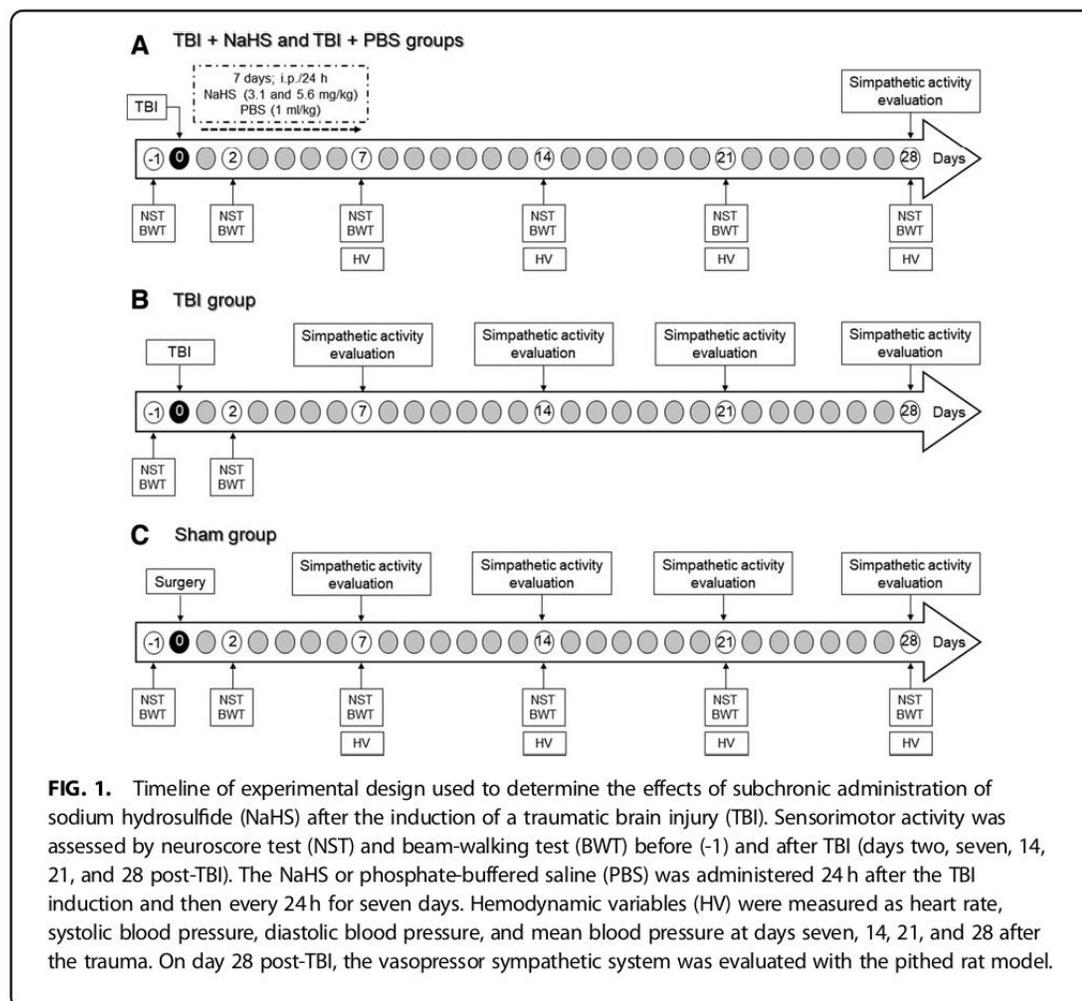
(b) TBI + phosphate buffered saline (PBS group [ $n=7$ ]). Animals were manipulated as mentioned above for the TBI + NaHS group except that they received PBS (1 mL/kg) instead of NaHS treatment. Hemodynamic variables, sensorimotor activity were determined as described previously for the TBI + NaHS group. At the end (day 28 after TBI), animals were pithed to determine vasopressor sympathetic activity.

(c) TBI group ( $n=24$ ). Animals underwent a TBI and then used to evaluate *in situ* progression of vasopressor sympathetic impairments. For that purpose, rats were subdivided into four sets and pithed at day seven, 14, 21, and 28 post-TBI ( $n=6$  per day).

(d) Sham group ( $n=30$ ). Animals were manipulated as the TBI group except that they did not received the trauma. Six animals were used to measure hemodynamic variables and sensorimotor activity. Twenty-four animals were pithed after surgery (day seven, 14, 21, and 28 post-TBI;  $n=6$  per interval).

### TBI induction

Anesthetized animals (ketamine, 80 mg/kg IP, xylazine 15 mg/kg IM [intramuscular]) were placed in a stereotaxic frame, and a sagittal incision was performed in the midline. The periosteum was removed, and a 5 mm craniotomy was made in the left hemisphere (-5.0 mm to bregma and -4.0 mm to sagittal suture) with a manual trephine. Once the dura mater integrity was verified, a female plastic luer lock was fixed to the craniotomy diameter with tissue adhesive



**FIG. 1.** Timeline of experimental design used to determine the effects of subchronic administration of sodium hydrosulfide (NaHS) after the induction of a traumatic brain injury (TBI). Sensorimotor activity was assessed by neuroscore test (NST) and beam-walking test (BWT) before (-1) and after TBI (days two, seven, 14, 21, and 28 post-TBI). The NaHS or phosphate-buffered saline (PBS) was administered 24 h after the TBI induction and then every 24 h for seven days. Hemodynamic variables (HV) were measured as heart rate, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and mean blood pressure at days seven, 14, 21, and 28 after the trauma. On day 28 post-TBI, the vasopressor sympathetic system was evaluated with the pithed rat model.

(VetBond 3M Science. Applied to Life™), and a stainless steel screw was placed in the skull over the frontal cortex as support. After proving no leakage on the luer lock system, both were attached to the skull by using dental acrylic.

At 90 min after anesthesia induction, animals were connected to a straight tip of a LFPI device (Am Science Instrument, Richmond, VA) through the luer lock to induce the traumatic lesion as reported previously.<sup>7</sup> Finally, the dental acrylic shell was removed, and the incision was sutured. Animals received tramadol (20 mg/kg sc [subcutaneously]) to avoid surgery-induced pain and were placed in individual acrylic cages on heating pads to regulate body temperature.

#### Neuroscore test

The neuroscore test is a battery of behavioral assessments that allows evaluating the sensorimotor function and

includes: (1) forelimb outstretching, (2) hindlimb outstretching, (3) resistance to body lateral pulsion, and (4) inclined plane test.<sup>7,29</sup> For each test, animals received a punctuation from 0 to 4 where 4 represents a normal sensorimotor function and 0 the total absence of sensorimotor function. A final score of 26–28 represents a normal condition, 20–25 points suggest mild TBI, 16–20 points were indicative of moderate TBI; meanwhile 15 points or less corresponded to severe TBI.<sup>7</sup>

#### Beam-walking test

The beam-walking test evaluates coordination and integration of motor movement. For this behavioral test, the capability of animals to walk through a transverse beam was evaluated.<sup>29</sup> Before test days, animals were habituated to the transverse beam. The beam was 120 cm long, 2.5 cm wide, and was placed at 43 cm above the

floor. For this test, two different parameters are considered. The first one is the time that it takes for the animal to go from the initial platform to the security box.

The second parameter is the punctuation that goes from 6 to 0 as follows: 6 points, the animal is able to cross with no foot-slips (normal function); 5 points are given when the animal crosses the beam with at least three foot-slips; 4 points correspond to six or more foot-slips when crossing the beam; 3 points when the animal is able to walk through the beam, but an affected limb does not aid in forwarding locomotion; 2 points, the animal falls down while walking in the beam; 1 point is assigned when the animal is unable to cross the beam but does not fall down; and 0 points are given when the rat falls down without walking through the beam.<sup>30</sup>

#### Determination of hemodynamic variables in awake animals

Hemodynamic variables included HR, SBP, DBP, and MBP. These variables were measured by the tail-cuff method using a LE 5001 automatic blood pressure recorder (Letical, PanLab, Barcelona, Spain). For that purpose, animals were immobilized in acrylic movement restrictors, and the tail was exposed to a heating lamp during 15 min. After that period, a cuff was placed in the tail and then inflated to stop blood flow. Then, the tension released allowed the measurement of hemodynamic variables. Two consecutive days before the test (seven, 14, 21, and 28 days post-TBI or sham), animals were habituated to the acrylic movement restrictors.<sup>28</sup>

#### Determination of vasopressor sympathetic system activity by pithed rat model

Animals were anesthetized with isoflurane (3%). Once anesthesia was confirmed, an incision in the ventral neck was performed to expose and cannulate the trachea to artificially ventilate animals with room air using a positive pressure pump (7025 rodent ventilator, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy) at 56 strokes/min and a stroke volume of 20 mL/kg, as described previously.<sup>31</sup> Later, animals were pithed by inserting a stainless-steel rod through the orbit and foramen magnum into the vertebral foramen to destroy the central nervous system.<sup>32,33</sup> It is important to mention that the pithed rat model has been employed previously to evaluate vasopressor sympathetic impairments triggered during the interictal period in amygdala-kindled rats.<sup>34</sup>

Far ahead, a bilateral vagotomy was performed, and catheters were placed in the left femoral vein for drugs administration and the left carotid artery. The latter was connected to a pressure transducer (RX104A, Biopac Systems Inc., Goleta, CA) to record arterial blood pressure and HR, simultaneously, by using a data acquisition unit (MP150A-CE, Biopac Systems Inc.) and the Acknowledge software v4.0.1 (Biopac Systems Inc.).

#### Experimental design in pithed rats

After the procedure mentioned above, the stainless-steel rod was replaced by an isolated bipolar electrode except for 1 cm length 9 cm from the tip. The 1 cm unenameled segment was situated in the T<sub>7</sub>-T<sub>0</sub> region of the spinal cord. In this region, the pre-ganglionic nerves supplying the systemic vasculature are located; thus, selective stimulation of vasopressor sympathetic outflow is allowed.<sup>33</sup> Before electrical stimulation, animals received an intravenous (iv) bolus of gallamine (25 mg/kg) to avoid electrically induced muscle twitching.

The vasopressor sympathetic outflow was stimulated by using an S88X square pulse stimulator (Grass Technologies, Warwick, RI) by applying 10 sec trains of monophasic, rectangular pulses (2 msec, 60 V) at increasing frequencies (0.03, 0.1, 0.3, 1 and 3 Hz). These frequencies deliver, respectively, one, one, three, 10, and 30 pulses/train during 10 sec.

After the stimuli-response curve was completed, the vasopressor responses induced by iv bolus injections of  $\alpha$ -adrenoceptor agonists were evaluated consecutively as follows: (1) exogenous noradrenaline (0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3  $\mu$ g/kg;  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, endogenous ligand); (2) methoxamine (1, 3, 10, 30, and 100  $\mu$ g/kg; selective  $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist); and (3) UK 14,304 (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, and 30  $\mu$ g/kg; selective  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist). The interval between the different stimuli or doses was dependent on the duration of the resulting vasopressor response. After each dose-response curve, the cannula system in the femoral vein was washed to eliminate the presence of the previous drug.

The maximum changes in DBP to either electrical stimulation or  $\alpha$ -adrenoceptors agonists in pithed rats were determined. The DBP was determined because this is the blood pressure when the left ventricle is relaxed and could indirectly represent the systemic vascular resistance.

#### Drugs

Besides anaesthetics ketamine (Anestek,<sup>®</sup> PiSA Agropecuaria, Jal, Mexico), xylazine (Procin,<sup>®</sup> PiSA Agropecuaria, Jal, Mexico), and isoflurane (Fluriso,<sup>™</sup> Vet Ones, Boise, ID, U.S.A.), the compounds used in the present study (obtained from the sources indicated) were: gallamine triethiodide; ( $\pm$ )-noradrenaline bitartrate, methoxamine hydrochloride, UK 14,304, and sodium hydrosulfide monohydrate (NaHS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Noradrenaline, methoxamine, and gallamine were dissolved in physiological saline. The UK 14,304 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) 0.1 %. The NaHS, H<sub>2</sub>S donor, was dissolved in PBS, pH 7.4 and 25°C; for pharmacological treatments, new solutions were prepared every day.

**Data presentation and statistical analysis**

All results in figures and tables are presented as mean ± standard error of the mean. The differences in hemodynamic variables between groups of animals were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) with a Dunnett *post hoc* test using the PBS group as indicated in each figure. The *t* tests were performed to: (1) compare the PBS group with the sham group; and (2) moderate with severe TBI groups in Table 1. The difference of the changes in DBP between groups of animals, as well as the results of sensorimotor function, were evaluated by a Tukey test once the two-way ANOVA reached statistical significance. Statistical analysis was performed with SigmaPlot v12.0 (Systat Software, Inc.). Statistical significance was accepted when *p* < 0.05.

**Results**

**TBI induces sensorimotor, hemodynamic and sympathetic impairments**

In our study, the neuroscore and beam-walking test showed that sensorimotor activity and motor coordination of the sham group did not change throughout the experimental time (Fig. 2).

Plethysmographic measurements of hemodynamic variables revealed that the sham group showed physiological values of HR (day seven, 327 ± 7 beats per min [bpm]; day 14, 332 ± 7 bpm; day 21, 342 ± 14 bpm; day 28, 384 ± 12 bpm), SBP (day seven, 115 ± 2 mm Hg; day 14, 105 ± 1 mm Hg; day 21, 118 ± 2 mm Hg; day 28, 122 ± 2 mm Hg), DBP (day seven, 84 ± 2 mm Hg; day 14, 78 ± 1 mm Hg; day 21, 89 ± 4 mm Hg; day 28, 87 ± 4 mm Hg), and MBP (day seven, 94 ± 1 mm Hg; day 14, 87 ± 1 mm Hg; day 21, 100 ± 4 mm Hg; day 28, 100 ± 4 mm Hg) (Fig. 3–6). In addition, the vasopressor responses of the sham group in pithed rats were constant in every day of experimentation (Fig. 7, 8).

The animals in TBI + PBS group received a fluid percussion of 3.39 ± 0.39 atm (Table 1). After TBI induction, there was a significant decrease in neuroscore performance when compared with the sham group (day two,

61%; day seven, 20%; day 14, 26%; day 21, 12%; day 28, 15%;  $F_{(1,5)} = 15.635$ ; *p* < 0.001; Fig. 2A). Although a time-dependent recovery was observed, the TBI + PBS group did not reach neuroscore points in the sham group at any day of evaluation (day two, *p* < 0.001; day seven, *p* < 0.001; day 14, *p* < 0.001; day 21, *p* = 0.001; day 28, *p* < 0.001; Fig. 2A).

On the other hand, a reduction in the performance in transverse beam at day two (59%; *p* < 0.001), day seven (28%; *p* < 0.001), and day 14 (15%; *p* = 0.016) post-TBI compared with the sham group was observed. At 21 and 28 days after TBI, the TBI + PBS group reached those values observed in the sham group (day 21, *p* = 0.130; day 28, *p* = 0.069). In addition, the time that the animals took to walk through the beam was significantly higher after TBI ( $F_{(1,5)} = 13.667$ ; *p* < 0.001; Fig. 2C), particularly two days post-TBI (767%; *p* < 0.001).

Interestingly, there was an increase in the HR after seven days (20%; *p* = 0.007) but not 14 (*p* = 0.173), 21 (*p* > 0.99), or 28 (*p* > 0.99) days post-TBI when compared with the sham group (Fig. 3). In addition, a significant increase at seven, 14, 21, and 28 days after TBI was observed in: (1) SBP (day seven, 46%, *p* < 0.001; day 14, 47%, *p* < 0.001; day 21, 30%, *p* < 0.001; day 28, 20%, *p* = 0.004; Fig. 4), (2) DBP (day seven, 63%, *p* < 0.001; day 14, 56%, *p* < 0.001; day 21, 42%, *p* < 0.001; day 28, 40%, *p* = 0.004; Fig. 5), and (3) MBP (day seven, 46%, *p* < 0.001; day 14, 52%, *p* < 0.001; day 21, 36%, *p* < 0.001; day 28, 31%, *p* = 0.004; Fig. 6), when compared with the TBI + PBS group versus the sham group. No statistical differences were found in the hemodynamic variables obtained from moderate TBI, when compared with those from severe TBI (Supplementary Fig. S1).

Animals used for *in situ* experiments, in pithed rats, to determine sympathetic impairments received a fluid percussion of 3.02 ± 0.21 atm for day seven; 2.96 ± 0.15 atm for day 14; 3.01 ± 0.23 atm for day 21; and 3.28 ± 0.14 atm for day 28 of evaluation ( $F_{(3,20)} = 0.602$ ; *p* = 0.621) (Table 2). After TBI, the vasopressor responses induced by electrical stimulation were significantly increased at

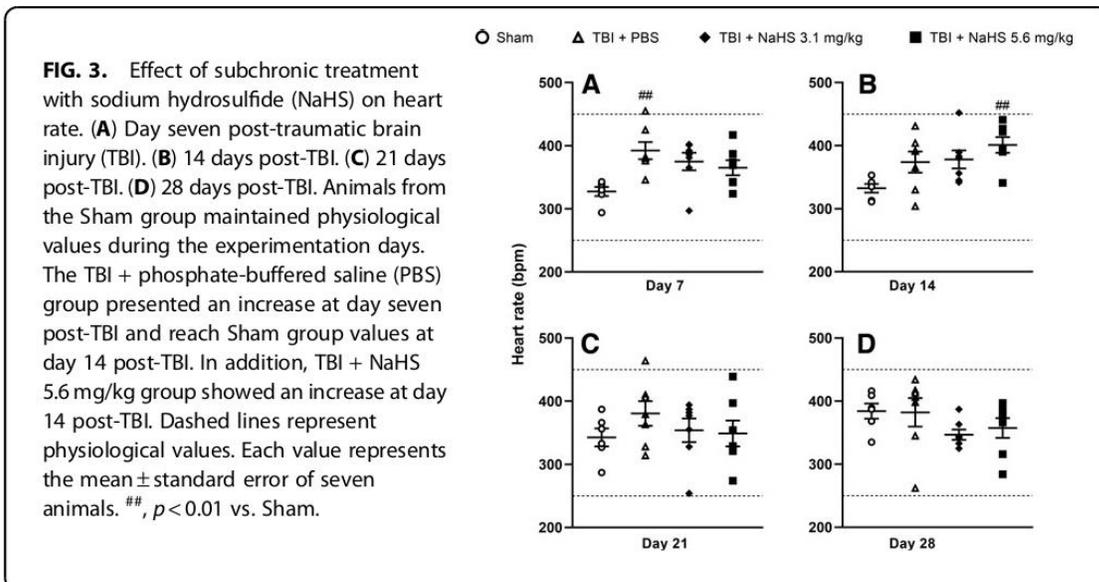
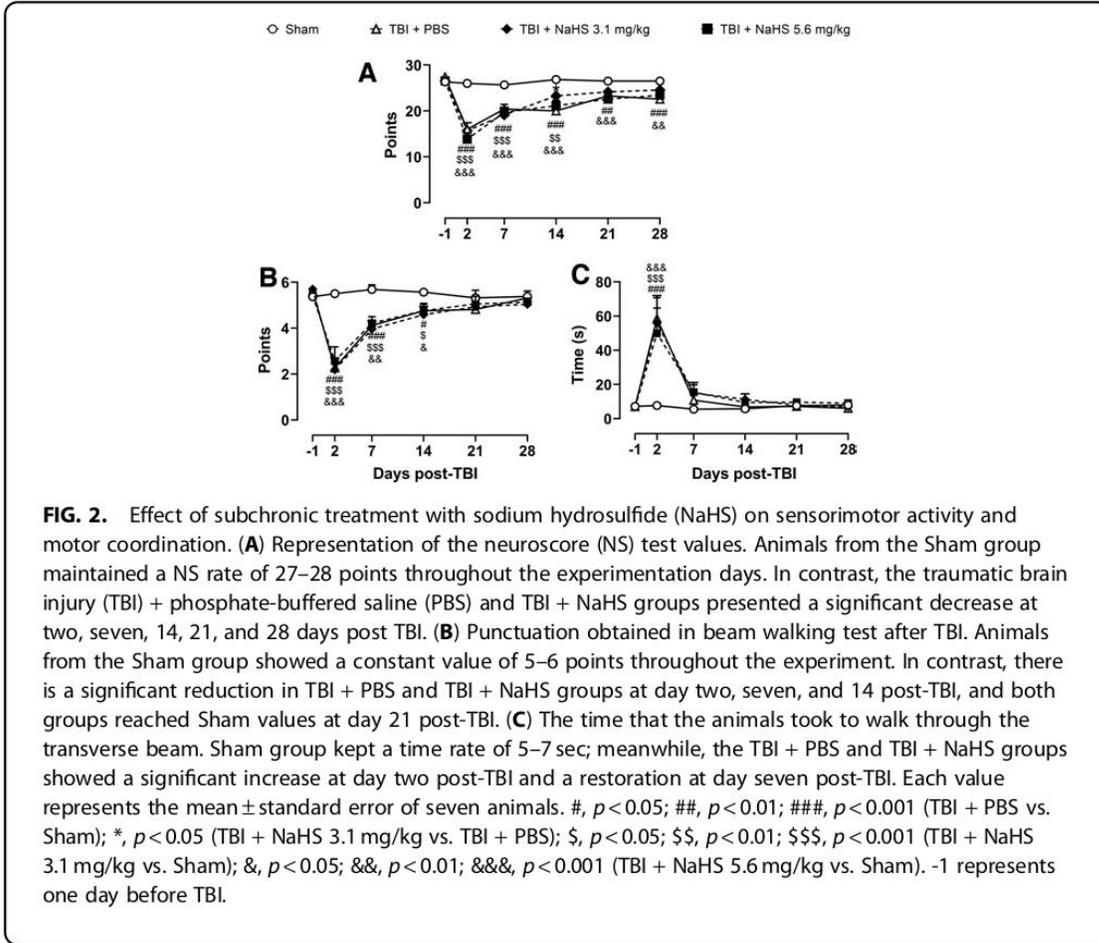
**Table 1. Traumatic Brain Injury Information and Neuroscore after Two Days in Hemodynamic Variables and Treatment Groups**

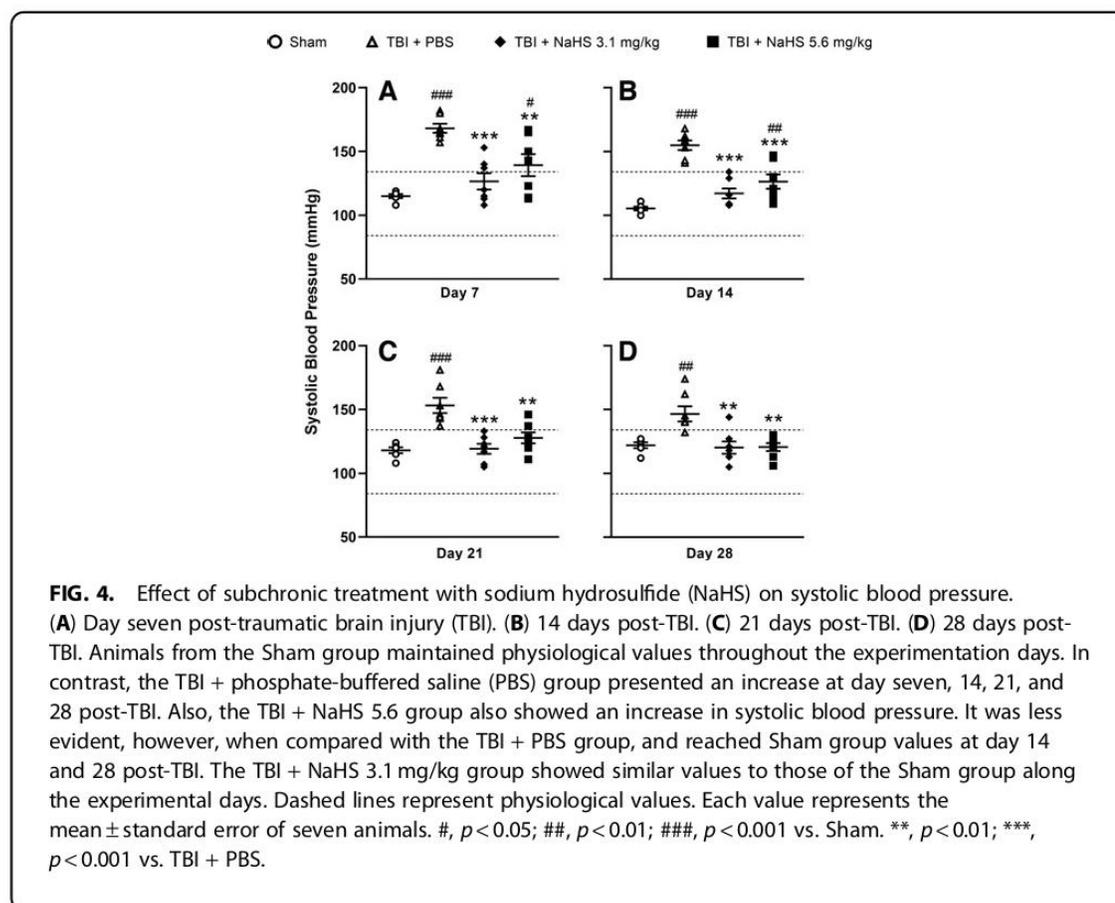
	Moderate TBI		Severe TBI		TBI+PBS (mL/kg)		TBI + NaHS 3.1		TBI + NaHS 5.6	
	Pressure (atm)	NS (points)	Pressure (atm)	NS (points)	Pressure (atm)	NS (points)	mg/kg			
							Pressure (atm)	NS (points)	Pressure (atm)	NS (points)
Media	3.17	18.00***	3.39	12.13	3.39	16.0	2.64	13.86	3.48	15.86
SD	0.50	1.63	0.76	3.091	0.96	2.24	0.84	3.72	1.26	2.6
SEM	0.19	0.62	0.27	1.093	0.39	0.85	0.32	1.40	0.47	0.99

TBI, traumatic brain injury; PBS, phosphate-buffered saline (1 mL/kg); NaHS, sodium hydrosulfide; NS, neuroscore 2 days after TBI; atm, atmospheres; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean.

Values represent eight animals per severity group (moderate and severe), and seven animals per experimental treatment groups (TBI + PBS, TBI + NaHS 3.1 and TBI + NaHS 5.6).

\*\*\*, *p* < 0.001 vs. severe with *t* test.





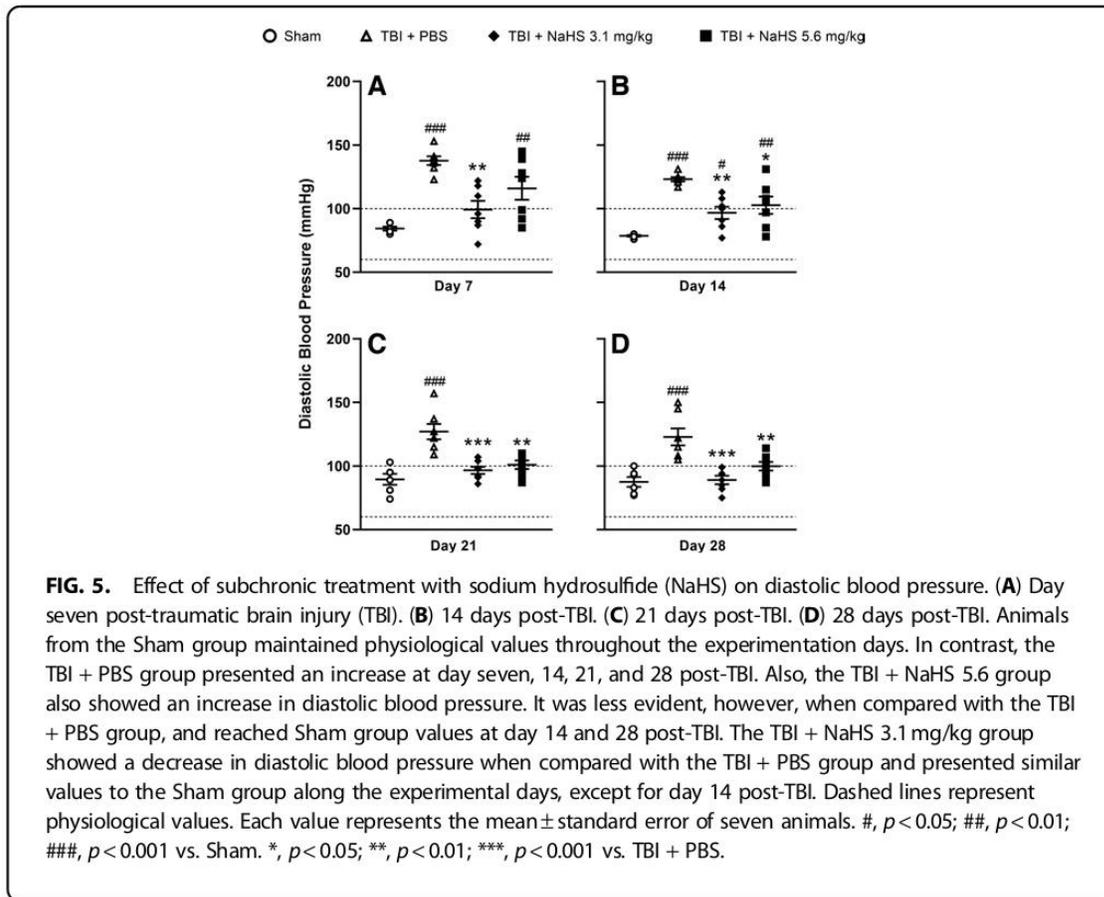
day seven ( $F_{(1,4)}=2.835$ ;  $p=0.034$ ; Fig. 7A), 14 ( $F_{(1,4)}=2.629$ ;  $p=0.047$ ; Fig. 7E), 21 ( $F_{(1,4)}=32.702$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 8A), and 28 ( $F_{(1,4)}=51.356$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 8E). On the other hand, a significant reduction in noradrenaline-induced responses was found after TBI at day seven ( $F_{(1,4)}=15.613$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 7B), 14 ( $F_{(1,4)}=14.734$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 7F), and 28 ( $F_{(1,4)}=58.150$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 8F) but not 21 ( $F_{(1,4)}=0.516$ ;  $p=0.725$ ; Fig. 8B).

The vasopressor responses induced by methoxamine remained unchanged throughout the experimentation days (day seven,  $F_{(1,4)}=0.477$ ;  $p=0.753$ ; Fig. 7C; day 14,  $F_{(1,4)}=0.239$ ;  $p=0.915$ ; Fig. 7G; day 21,  $F_{(1,4)}=2.737$ ;  $p=0.104$ ; Fig. 8C; and day 28,  $F_{(1,4)}=0.140$ ;  $p=0.967$ ; Fig. 8G). The vasopressor responses to UK 14,304 did not change at day seven ( $F_{(1,6)}=0.200$ ;  $p=0.976$ ; Fig. 7D) or 21 ( $F_{(1,6)}=0.639$ ;  $p=0.699$ ; Fig. 8D) post-TBI but were significantly decreased after TBI at days 14 ( $F_{(1,6)}=9.716$ ;  $p=0.003$ ; Fig. 7H) and 28 ( $F_{(1,6)}=30.348$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 8H).

Last, in the TBI + PBS group, a significant increase in vasopressor responses induced by selective electrical stimulation ( $F_{(1,4)}=36.786$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 9A) was observed. This effect was accompanied by a significant decrease in the vasopressor responses induced by noradrenaline ( $F_{(1,4)}=26.061$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 9B) and UK 14,304 ( $F_{(1,6)}=22.688$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 9C). No significant changes in the vasopressor responses to methoxamine ( $F_{(1,4)}=0.238$ ;  $p=0.916$ ; Fig. 7E) were found when compared with the sham group.

#### NaHS subchronic treatment prevents hemodynamic and sympathetic impairments after TBI

In the TBI + NaHS group, TBI was induced by applying a fluid percussion of  $2.64 \pm 0.32$  atm for 3.1 mg/kg ( $p=0.355$  vs. TBI + PBS group) and  $3.48 \pm 0.99$  atm for 5.6 mg/kg ( $p=0.972$  vs. TBI + PBS group) (Table 1). As result of the injury, the TBI + NaHS group showed a sensorimotor



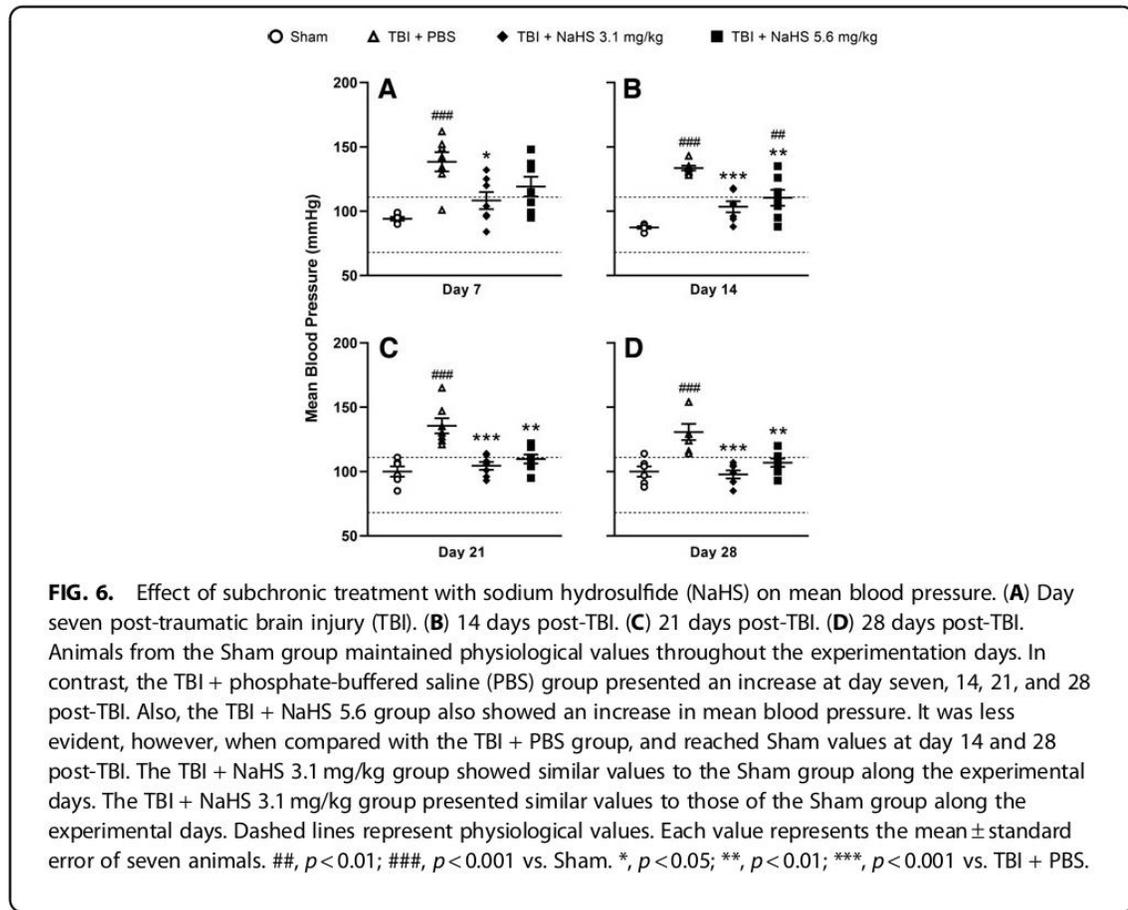
dysfunction similar to that of the TBI + PBS group (NaHS 3.1 mg/kg,  $F_{(1,5)}=1.873$ ,  $p=0.110$ ; NaHS 5.6 mg/kg,  $F_{(1,5)}=1.012$ ,  $p=0.417$ ; Fig. 2A) at day two (NaHS 3.1 mg/kg,  $p=0.826$ ; NaHS 5.6 mg/kg,  $p=0.081$ ), day seven (NaHS 3.1 mg/kg,  $p=0.324$ ; NaHS 5.6 mg/kg,  $p=0.557$ ), day 14 (NaHS 5.6 mg/kg,  $p=0.348$ ), day 21 (NaHS 3.1 mg/kg,  $p=0.510$ ; NaHS 5.6 mg/kg,  $p=0.557$ ), and day 28 (NaHS 3.1 mg/kg,  $p=0.127$ ; NaHS 5.6 mg/kg,  $p=0.481$ ) post-TBI, except for 3.1 mg/kg NaHS at day 14 post-TBI ( $p=0.013$ ).

Besides, the time that the animals took to walk through the beam in the TBI + NaHS group (NaHS 3.1 mg/kg,  $F_{(1,5)}=0.093$ ;  $p=0.993$ ; NaHS 5.6 mg/kg,  $F_{(1,5)}=0.351$ ;  $p=0.880$ ; Fig. 2C) was equal to that of the TBI + PBS group at every day of evaluation (day two, 3.1 mg/kg,  $p=0.766$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.292$ ; day seven, 3.1 mg/kg,  $p=0.637$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.570$ ; day 14, 3.1 mg/kg,  $p=0.617$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.756$ ; day 21, 3.1 mg/kg,  $p=0.941$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.765$ ; day 28, 3.1 mg/kg,  $p=0.922$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.708$ ).

Similarly, when compared with the TBI + PBS group, the score on transverse beam performance in the TBI +

NaHS group did not change (NaHS 3.1 mg/kg,  $F_{(1,5)}=0.138$ ;  $p=0.983$ ; NaHS 5.6 mg/kg,  $F_{(1,5)}=0.246$ ;  $p=0.940$ ; Fig. 2B) at any time of evaluation (day two, 3.1 mg/kg,  $p=0.973$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.483$ ; day seven, 3.1 mg/kg,  $p=0.414$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.815$ ; day 14, 3.1 mg/kg,  $p=0.658$ , 5.6 mg/kg,  $p>0.99$ ; day 21, 3.1 mg/kg,  $p=0.973$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.569$ ; day 28, 3.1 mg/kg,  $p=0.540$ , 5.6 mg/kg,  $p=0.663$ ).

With respect to hemodynamic variables, the values obtained for HR in the TBI + NaHS group did not change compared with the TBI + PBS group (3.1 mg/kg NaHS, day seven,  $p=0.738$ ; day 14,  $p=0.996$ ; day 21,  $p>0.99$ ; day 28,  $p>0.99$  and 5.6 mg/kg NaHS, day seven,  $p=0.402$ ; day 14,  $p=0.477$ ; day 21,  $p>0.99$ ; day 28,  $p>0.99$ ; Fig. 3). Regarding blood pressure, the values of SBP (day seven,  $p=0.542$ ; day 14,  $p=0.224$ ; day 21,  $p=0.998$ ; day 28,  $p=0.991$ ; Fig. 4), DBP (day seven,  $p=0.362$ ; day 21,  $p=0.672$ ; day 28,  $p=0.996$ ; Fig. 5), and MBP (day seven,  $p=0.467$ ; day 14,  $p=0.056$ ; day 21,  $p=0.888$ ; day 28,  $p=0.984$ ; Fig. 6) of TBI + NaHS (3.1 mg/kg) group were similar to those of the sham group, except for DBP at day 14 post-TBI (day 14,  $p=0.044$ ).



**FIG. 6.** Effect of subchronic treatment with sodium hydrosulfide (NaHS) on mean blood pressure. (A) Day seven post-traumatic brain injury (TBI). (B) 14 days post-TBI. (C) 21 days post-TBI. (D) 28 days post-TBI. Animals from the Sham group maintained physiological values throughout the experimentation days. In contrast, the TBI + phosphate-buffered saline (PBS) group presented an increase at day seven, 14, 21, and 28 post-TBI. Also, the TBI + NaHS 5.6 group also showed an increase in mean blood pressure. It was less evident, however, when compared with the TBI + PBS group, and reached Sham values at day 14 and 28 post-TBI. The TBI + NaHS 3.1 mg/kg group showed similar values to the Sham group along the experimental days. The TBI + NaHS 3.1 mg/kg group presented similar values to those of the Sham group along the experimental days. Dashed lines represent physiological values. Each value represents the mean  $\pm$  standard error of seven animals. #,  $p < 0.01$ ; ##,  $p < 0.001$  vs. Sham. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. TBI + PBS.

Interestingly, in TBI + NaHS (5.6 mg/kg) group, there was a significant decrease in the SBP at every day of evaluation compared with the TBI + PBS group (day seven, 17%,  $p = 0.010$ ; day 14, 18%,  $p < 0.001$ ; day 21, 17%,  $p = 0.002$ ; day 28, 18%,  $p = 0.002$ ; Fig. 4); meanwhile, the DBP and the MBP significantly decreased at day 14 (DBP, 17%,  $p = 0.015$ ; MBP, 17%,  $p = 0.03$ ), day 21 (DBP, 20%,  $p = 0.001$ ; MBP, 19%,  $p = 0.001$ ), and day 28 (DBP, 19%,  $p = 0.008$ ; MBP, 18%,  $p = 0.004$ ) but

not day seven (DBP,  $p = 0.083$ ; MBP,  $p = 0.183$ ) when compared with the TBI + PBS group (Fig. 5, 6).

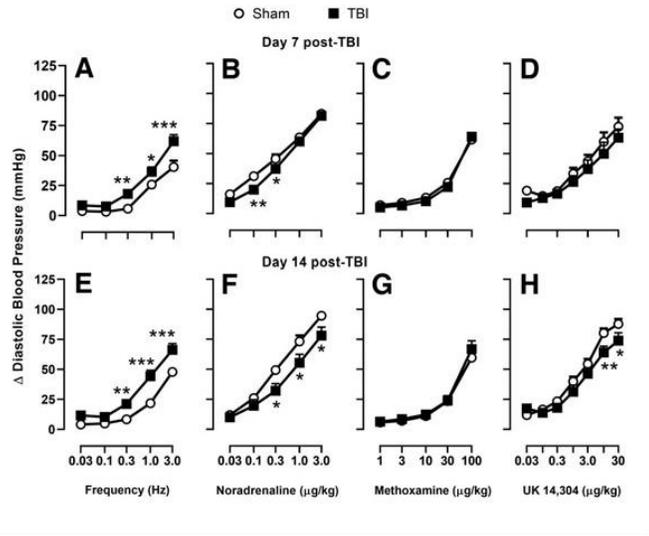
On the other hand, when the vasopressor responses induced by selective electrical stimulation of the sympathetic outflow were analyzed, we observed that the TBI + NaHS group (3.1 and 5.6 mg/kg) showed similar responses to those obtained in the sham group (3.1 mg/kg,  $F_{(1,4)} = 1.343$ ;  $p = 0.267$ ; and 5.6 mg/kg,  $F_{(1,4)} = 0.158$ ;  $p = 0.958$ ; Figs. 9E and 9I). Unexpectedly, noradrenaline-induced vasopressor

**Table 2. Traumatic Brain Injury Information and Neuroscore after Two Days in Sympathetic Activity Groups**

	Days after TBI							
	7		14		21		28	
	Pressure (atm)	NS (points)						
Media	3.02	16.17	3.13	15.67	3.46	16.33	3.24	15.17
SD	0.53	2.04	0.18	2.25	1.03	2.06	0.48	2.71
SEM	0.21	0.83	0.10	0.92	0.42	0.84	0.20	1.11

TBI, traumatic brain injury; NS, neuroscore 2 days after TBI; atm, atmospheres; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean. Values represent six animals per experimental group.

**FIG. 7.** Impairments of vasopressor sympathetic system activity in pithed rat at seven and 14 days post-traumatic brain injury (TBI). Vasopressor responses induced by selective sympathetic stimulation (**A**, seven days; **E**, 14 days), noradrenaline ( $\alpha_{1/2}$  agonist; **B**, seven days; **F**, 14 days), methoxamine ( $\alpha_1$  selective agonist; **C**, seven days; **G**, 14 days), and UK 14,304 ( $\alpha_2$  selective agonist; **D**, seven days; **H**, 14 days). Each value represents the mean  $\pm$  standard error of six animals. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. Sham.



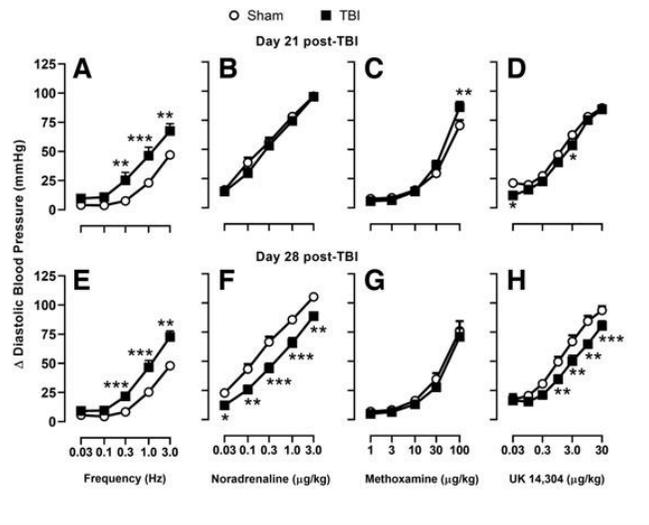
responses in the TBI + NaHS (3.1 and 5.6 mg/kg) group were significantly lower than in the TBI + PBS group (3.1 mg/kg,  $F_{(1,4)}=9.492$ ;  $p=0.003$ ; and 5.6 mg/kg,  $F_{(1,4)}=22.171$ ;  $p < 0.001$ ; Figs. 9F and 9J) and the sham group (3.1 mg/kg,  $F_{(1,4)}=64.579$ ;  $p < 0.001$ ; and 5.6 mg/kg,  $F_{(1,4)}=88.381$ ;  $p < 0.001$ ; Figs. 9F and 9J). Nevertheless, in the TBI + NaHS group (3.1 and 5.6 mg/kg), the vasopressor responses induced by methoxamine (3.1 mg/kg,  $F_{(1,4)}=1.256$ ,  $p=0.268$ ; and 5.6 mg/kg,  $F_{(1,4)}=0.333$ ,  $p=0.567$ ; Figs. 9G and 9K) or UK 14,304 (3.1 mg/kg,  $F_{(1,6)}=0.179$ ,  $p=0.674$ ; and 5.6 mg/kg,  $F_{(1,6)}=0.562$ ,  $p=0.456$ ; Figs. 9H and 9L) did not change when compared with the TBI + PBS group.

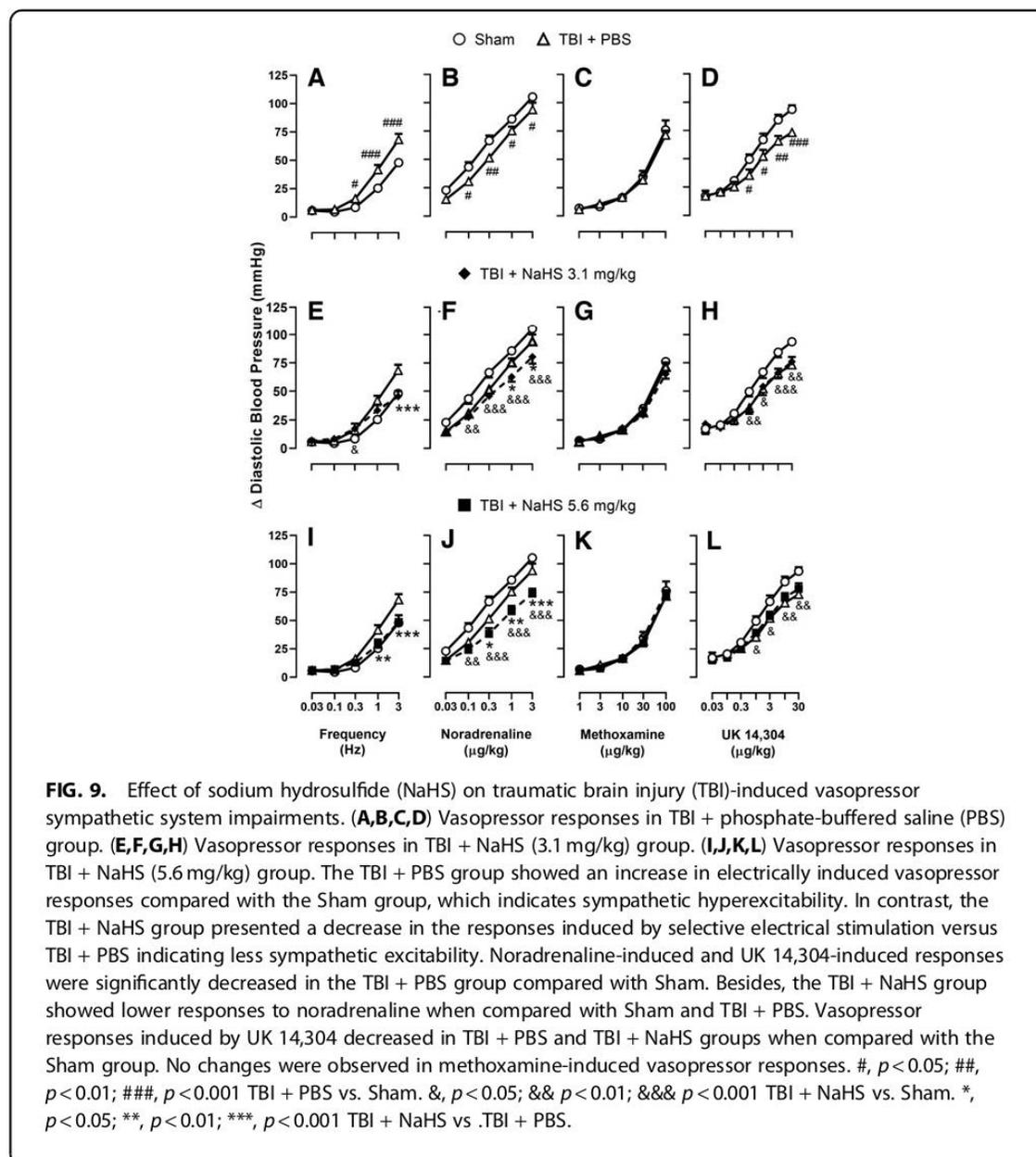
**Discussion**

Traumatic brain injury is a complex pathological process that involves central and systemic damage. Systemic effects of TBI are an underrecognized group of alterations, although they influence the outcome of patients.<sup>13</sup> This injury has been studied pre-clinically by using several animal models, such as the LFPI model. This model allows to induce mild (0.1–1.0 atm), moderate (1.5–2.0 atm), and severe TBI (2.6–3.6 atm).<sup>35</sup> In this sense, some events such as glutamate release,<sup>36</sup> neurogenesis,<sup>37</sup> and long-term spatial learning-memory impairments<sup>38</sup> depend on TBI severity.

According to the atmospheres of the pulse pressure (2.6–3.6 atm), TBI could be classified as severe in all

**FIG. 8.** Impairments of vasopressor sympathetic system activity in pithed rat at 21 and 28 days post-traumatic brain injury (TBI). Vasopressor responses induced by selective sympathetic stimulation (**A**, 21 days; **E**, 28 days), noradrenaline ( $\alpha_{1/2}$  agonist; **B**, 21 days; **F**, 28 days), methoxamine ( $\alpha_1$  selective agonist; **C**, 21 days; **G**, 28 days), and UK 14,304 ( $\alpha_2$  selective agonist; **D**, 21 days; **H**, 28 days). Each value represents the mean  $\pm$  standard error of six animals. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. Sham.





experimental groups (Table 1). Based on the neuroscore scale (16–20 points to moderate and  $\leq 15$  points to severe), however, the TBI severity could be classified as moderate in some groups (Table 1).<sup>7</sup> This lack of correlation between impact pressure has been demonstrated recently in a multi-center study<sup>39</sup> and may be explained by interindividual variability.<sup>40</sup>

Therefore, to exclude the influence of TBI severity in further results, animals were divided into moderate and severe TBI for hemodynamic variables measure-

ment. We found that, under our experimental conditions, the impairments on hemodynamic variables were independent of TBI severity. Thus, for this experimental protocol purpose, both severities were grouped. Accordingly, moderate and severe TBI has been grouped in clinical studies.<sup>41</sup>

Notwithstanding the relevance of cardiovascular impairments after TBI, pharmacological approaches for these TBI consequences have been poorly studied. In this context, it has been reported that H<sub>2</sub>S exerts

important effects on the cardiovascular system.<sup>42</sup> Moreover, the newest member of the gasotransmitter family represents a potential therapy in brain diseases, including TBI.<sup>19,20</sup> The present study demonstrates for the first time that TBI induces hemodynamic, sensorimotor, and sympathetic impairments for at least 28 days. Further, subchronic administration of NaHS ameliorated hemodynamic changes observed after TBI. In addition, post-TBI sympathetic hyperactivity was reversed after NaHS administration. Nevertheless, NaHS did not exert a beneficial effect on sensorimotor dysfunction or  $\alpha_2$  adrenergic receptors impairments secondary to TBI.

### Sensorimotor dysfunction

Sensorimotor function and motor coordination are regulated by brain areas such as the sensorimotor cortex, striatum, cerebellum, among others.<sup>43</sup> In this context, it has been demonstrated that TBI induces damage to those cerebral structures promoting impairment of sensorimotor function (up to six months after TBI) and motor coordination (up to one month after TBI).<sup>44</sup> According to this evidence, we found that sensorimotor function remained affected for at least 28 days of evaluation; meanwhile, motor coordination recovered at day 21 post-TBI.

Unfortunately, under our experimental conditions, NaHS subchronic treatment did not improve the sensorimotor dysfunction observed after TBI. Conversely, previous studies have shown that acute NaHS or ATB-346 administration was capable of improving motor function.<sup>6,23</sup> In this regard, the lack of effect under our experimental conditions could probably be because of differences in the NaHS administration scheme. Moreover, ATB-346 is an H<sub>2</sub>S donor derived of naproxen, suggesting that cyclooxygenase inhibition, besides H<sub>2</sub>S levels increase, is necessary to achieve the effect on sensorimotor function.<sup>23</sup>

### Hemodynamic variables impairments in awake animals

Traumatic brain injury has been associated with cardiovascular impairments. Indeed, it has been described that hypertension and major adverse cardiovascular and cerebrovascular events are associated with TBI.<sup>45,46</sup> In this sense, under our experimental conditions, we found an increase in hemodynamic variables (HR, SBP, DBP, and MBP). Consistent with our findings, an increase in blood pressure has been reported previously in clinical<sup>10,41</sup> and pre-clinical<sup>12,47</sup> studies after brain injury. Conversely, a decrease in BP and HR has been observed up to 4 h after TBI.<sup>48</sup>

Our results, however, show the increase in hemodynamic variables on day seven post-TBI. The HR increase was reversed after 14 days; meanwhile, SBP, DBP, and MBP increases remained for at least 28

days after TBI induction. Our results show that NaHS subchronic treatment did not affect HR increases observed after TBI. In this sense, it has been reported previously that chronic NaHS administration reversed HR impairments induced by obesity.<sup>28</sup> Nevertheless, our findings show a *per se* restoration of HR 21 days after TBI. Notably, we found that subchronic administration of NaHS (3.1 and 5.6 mg/kg) improved the impairment observed in blood pressure.

Although no studies have been performed to elucidate the effect of H<sub>2</sub>S in TBI-induced cardiovascular impairments, it is well known that H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes knockout leads to an increase in blood pressure in mice.<sup>49</sup> Moreover, H<sub>2</sub>S donors administration induces a decrease of blood pressure in several hypertension models such as high fat diet-induced obesity,<sup>28</sup> L-NAME-induced hypertension,<sup>50</sup> and Dahl salt-sensitive rats.<sup>51</sup> In this context, a decrease in H<sub>2</sub>S plasmatic levels in animals with TBI has been observed, which may suggest a dysregulation of the H<sub>2</sub>S pathway after brain injury.<sup>21</sup>

In the present study, we demonstrate that the H<sub>2</sub>S exogenous administration contributes to restoring the hemodynamic impairments observed after TBI. The route of administration of NaHS was intraperitoneal, and H<sub>2</sub>S is a gasotransmitter that can cross cellular membranes reaching several brain areas.<sup>52</sup> Hence, the mechanisms underlying the effect in hemodynamic variables may involve central as well as peripheral targets. In this context, it has been reported that H<sub>2</sub>S regulates the cardiovascular system by: (1) acting in central structures such as NTS, PVN and RVLM<sup>53-55</sup>; (2) modulating peripheral sympathetic transmission<sup>17,18</sup>; (3) modulating heart<sup>56</sup> and blood vessels.<sup>57</sup>

### Vasopressor sympathetic system activity impairments

The cardiovascular system is widely regulated by several mechanisms, including the autonomic nervous system.<sup>58</sup> In this regard, several clinical and pre-clinical studies have demonstrated an autonomic system unbalance calculated following different experimental approaches and measurements after TBI.<sup>10,59,60</sup> Moreover, an increase of monoamines synthesis and release has been shown in patients and animal models of TBI as responsible for autonomic dysfunction.<sup>61-63</sup>

Although those studies provided information about sympathetic nervous system status after TBI, we measured sympathetic nerves reactivity and  $\alpha$ -adrenoceptor pharmacological functionality in blood vessels with selective electrical stimulation and exogenous  $\alpha$ -adrenoceptor agonist administration. Our results showed an increase in sympathetic activity from day seven to day 28 after TBI. Moreover, we found a decrease in noradrenaline and UK 14,304 responses, which may suggest an

impairment not only in sympathetic neurons transmission but also in  $\alpha$ -adrenoceptors located in blood vessels. In this context, an impairment in  $\alpha$ -adrenoceptor signaling in the rat brain after TBI has been suggested previously.<sup>64,65</sup>

Taking into account the diminished responses to UK 14,304, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor selective agonist, the increase in sympathetic activity may be explained by a decrease in  $\alpha_2$ -mediated automodulation of sympathetic neurons. In this regard, it has been previously demonstrated that the activation of  $\alpha_2$  adrenergic receptors with dexmedetomidine, a highly selective agonist, exerts neuroprotective effects and has been proposed as a treatment for paroxysmal autonomic instability with dystonia after TBI.<sup>66,67</sup> Conversely, atipamezole treatment, a selective  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, improved sensorimotor function and reduced seizure susceptibility in the pentylenetetrazol test with no effect on epilepsy development and Morris water-maze spatial learning and memory test in a murine model of TBI.<sup>68</sup>

Interestingly, NaHS subchronic administration decreased the sympathetic hyperactivity. According to this, an inhibitory effect of H<sub>2</sub>S in sympathetic transmission has been described previously *in vitro* and *in vivo* under physiological conditions<sup>17,69</sup> and an animal model of obesity induced by high-fat diet.<sup>28</sup> Unexpectedly, our results showed a decrease in vasopressor responses induced by noradrenaline ( $\alpha_{1/2}$ -adrenoceptor agonist) but not by methoxamine ( $\alpha_1$ -adrenoceptor selective agonist) or UK 14,304 ( $\alpha_2$ -adrenoceptor selective agonist) after NaHS subchronic treatment. This effect observed after  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  adrenergic receptor simultaneous activation with noradrenaline may suggest a heterodimer formation because no effect was observed after independent activation of each  $\alpha$ -adrenoceptor subtype with methoxamine or UK 14,304.

In this sense, it has been shown previously that  $\alpha$ -adrenoceptors form homo- and hetero-dimers that contribute to hypertension development.<sup>70,71</sup> Moreover, G protein-coupled receptor heteroreceptor complexes have been widely implied in brain networks modulation in physiological and pathophysiological conditions.<sup>72</sup> More studies to confirm this possibility are required, however. On the other hand, the decrease in vasopressor responses induced by selective electrical stimulation may be explained by the reduction in  $\alpha$ -adrenoceptor activation.

At this point, it should be admitted that NaHS is able to decrease sympathetic activity by RVLM inhibition.<sup>73</sup> This possibility, however, could be excluded in our results by the lack of central nervous system modulation in the pithed rat model.<sup>32</sup> Thus, it may be suggested that NaHS effects in our results depend only on peripheral sympathetic transmission. Although sympathetic outflow inhibition may represent an underlying mechanism for NaHS effects in hemodynamic impairments,

more studies are needed to explain the neuroprotective and cardioprotective effects of H<sub>2</sub>S in TBI. The effects of the central administration of H<sub>2</sub>S donors after TBI and the effects on cardiac function fall beyond the scope of this study.

### Conclusion

Taken together, our results demonstrate that TBI induces hemodynamic and sensorimotor effects, as well as sympathetic hyperactivity. Further, NaHS subchronic administration during seven days post-TBI is able to prevent the development of hemodynamic impairments and sympathetic hyperactivity with no effects on sensorimotor dysfunction. These findings shed further light on the potential therapeutic role of H<sub>2</sub>S for systemic cardiovascular impairments observed after TBI.

### Acknowledgments

This work is part of the PhD dissertation of SHC. CON-ACyT scholarships were given to SHC (615619), CLSC (615621), and GJMT (723258).

### Authors' Contributions

SHC, LR, and DC conceived the original idea; SHC, ASL, CLSC, ADPR, and GJMT data acquisition; SHC, LR, DCP, and ASL data analysis and interpretation; SHC original draft writing; LR, DC, and ASL original draft review and editing.

### Funding Information

The National Council for Science and Technology (CONACyT) supported this study (Grant No. 252702).

### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### Supplementary Material

Supplementary Figure S1

### References

1. GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators. (2019). Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18, 56–87.
2. Frieden, T.R., Houry, D., and Baldwin, G. (2015). *Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation*. CDC NIH Rep. to Congress, 1–74.
3. Kaur, P., and Sharma, S. (2018). Recent advances in pathophysiology of traumatic brain injury. *Curr. Neuropharmacol.* 16, 1224–1238.
4. D'Ambrosio, R., Fairbanks, J.P., Fender, J.S., Born, D.E., Doyle, D.L., and Miller, J.W. (2004). Post-traumatic epilepsy following fluid percussion injury in the rat. *Brain* 127, 304–314.
5. Lozano, D., Gonzales-Portillo, G.S., Acosta, S., de la Pena, I., Tajiri, N., Kaneko, Y., and Borlongan, C.V. (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 11, 97–106.
6. Jiang, X., Huang, Y., Lin, W., Gao, D., and Fei, Z. (2013). Protective effects of hydrogen sulfide in a rat model of traumatic brain injury via activation of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reduction of oxidative stress. *J. Surg. Res.* 184, e27–e35.

7. McIntosh, T.K., Vink, R., Noble, L., Yamakami, I., Fernyak, S., Soares, H., and Faden, A.L. (1989). Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 28, 233–244.
8. Goldstein, B., Towell, D., Lai, S., Sonnenthal, K., and Kimberly, B. (1998). Uncoupling of the autonomic and cardiovascular systems in acute brain injury. *Am. J. Physiol.* 275, R1287–R1292.
9. McMahon, C.G., Kenny, R., Bennett, K., Little, R., and Kirkman, E. (2011). Effect of acute traumatic brain injury on baroreflex function. *Shock* 35, 53–58.
10. Hilz, M.J., Wang, R., Markus, J., Ammon, F., Hösl, K.M., Flanagan, S.R., Winder, K., and Koehn, J. (2017). Severity of traumatic brain injury correlates with long-term cardiovascular autonomic dysfunction. *J. Neurol.* 264, 1956–1967.
11. Heffernan, D.S., Inaba, K., Arbabi, S., and Cotton, B.A. (2010). Sympathetic hyperactivity after traumatic brain injury and the role of beta-blocker therapy. *J. Trauma* 69, 1602–1609.
12. Chen, J., Chen, W., Han, K., Qi, E., Chen, R., Yu, M., Hou, L., and Lv, L. (2019). Effect of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla on sympathetic hyperactivity after traumatic brain injury. *Eur. J. Neurosci.* 50, 1972–1980.
13. Lv, L.Q., Hou, L.J., Yu, M.K., Qi, X.Q., Chen, H.R., Chen, J.X., Hu, G.H., Luo, C., and Lu, Y.C. (2010). Prognostic influence and magnetic resonance imaging findings in paroxysmal sympathetic hyperactivity after severe traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 27, 1945–1950.
14. Meng, G., Zhao, S., Xie, L., Han, Y., and Ji, Y. (2018). Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 175, 1146–1156.
15. Panthi, S., Manandhar, S., and Gautam, K. (2018). Hydrogen sulfide, nitric oxide, and neurodegenerative disorders. *Transl. Neurodegener.* 7, 3.
16. Centurión, D., de la Cruz, S.H., Castillo-Santiago, S.V., Becerril-Chacón, M.E., Torres-Pérez, J.A., and Sánchez-López, A. (2018). NaHS prejunctionally inhibits the cardioaccelerator sympathetic outflow in pithed rats. *Eur. J. Pharmacol.* 823, 35–40.
17. Centurión, D., de la Cruz, S.H., Gutiérrez-Lara, E.J., Beltrán-Ornelas, J.H., and 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, 40–45.
18. Guo, Q., Wu, Y., Xue, H., Xiao, L., Jin, S., and Wang, R. (2016). Perfusion of isolated carotid sinus with hydrogen sulfide attenuated the renal sympathetic nerve activity in anesthetized male rats. *Physiol. Res.* 65, 413–423.
19. Che, X., Fang, Y., Si, X., Wang, J., Hu, X., Reis, C., and Chen, S. (2018). The role of gaseous molecules in traumatic brain injury: an updated review. *Front. Neurosci.* 12, 392.
20. Zhang, J.Y., Ding, Y.P., Wang, Z., Kong, Y., Gao, R., and Chen, G. (2017). Hydrogen sulfide therapy in brain diseases: from bench to bedside. *Med. Gas Res.* 7, 113–119.
21. Zhang, M., Shan, H., Wang, T., Liu, W., Wang, Y., Wang, L., Zhang, L., Chang, P., Dong, W., Chen, X., and Tao, L. (2013). Dynamic change of hydrogen sulfide after traumatic brain injury and its effect in mice. *Neurochem. Res.* 38, 714–725.
22. Zhang, M., Shan, H., Chang, P., Ma, L., Chu, Y., Shen, X., Wu, Q., Wang, Z., Luo, C., Wang, T., Chen, X., and Tao, L. (2017). Upregulation of 3-MST relates to neuronal autophagy after traumatic brain injury in mice. *Cell. Mol. Neurobiol.* 37, 291–302.
23. Campolo, M., Esposito, E., Ahmad, A., Di Paola, R., Paterniti, I., Cordaro, M., Bruschetta, G., Wallace, J.L., and Cuzzocrea, S. (2014). Hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor ATB-346 enhances motor function and reduces cortical lesion volume following traumatic brain injury in mice. *J. Neuroinflammation* 11, 196.
24. Karimi, S.A., Hosseinmardi, N., Janahmadi, M., Sayyah, M., and Hajisoltani, R. (2017). The protective effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on traumatic brain injury (TBI) induced memory deficits in rats. *Brain Res. Bull.* 134, 177–182.
25. Zhang, M., Shan, H., Chang, P., Wang, T., Dong, W., Chen, X., and Tao, L. (2014). Hydrogen sulfide offers neuroprotection on traumatic brain injury in parallel with reduced apoptosis and autophagy in mice. *PLoS One* 9, e87241.
26. Xu, K., Wu, F., Xu, K., Li, Z., Wei, X., Lu, Q., Jiang, T., Wu, F., Xu, X., Xiao, J., Chen, D., and Zhang, H. (2018). NaHS restores mitochondrial function and inhibits autophagy by activating the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway to improve functional recovery after traumatic brain injury. *Chem. Biol. Interact.* 286, 96–105.
27. National Research Council of the National Academies. (2011). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed. Washington, DC: The National Academies Press.
28. Gomez, C.B., de la Cruz, S.H., Medina-Terol, G.J., Beltrán-Ornelas, J.H., Sánchez-López, A., Silva-Velasco, D.L., and Centurión, D. (2019). Chronic administration of NaHS and L-Cysteine restores cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 863, 172707.
29. Hausser, N., Johnson, K., Parsley, M.A., Guptarak, J., Spratt, H., and Sell, S.L. (2018). Detecting behavioral deficits in rats after traumatic brain injury. *J. Vis. Exp.* 2018, 56044.
30. Ohlsson, A.L., and Johansson, B.B. (1995). Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke* 26, 644–649.
31. Kleinman, L.I., and Radford, E.P. (1964). Ventilation standards for small mammals. *J. Appl. Physiol.* 19, 360–362.
32. Centurión, D., Cobos-Puc, L.E., Ramírez-Rosas, M.B., Gómez-Díaz, B., Sánchez-López, A., and 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: Rocha, L., and Granados-Soto, V. (eds). *Models in Neuropharmacology*. Kerala, India: Transworld Research Network, pps. 91–97.
33. Gillespie, J.S., and 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, 78–87.
34. Ruiz-Salinas, I., Rocha, L., Marichal-Cancino, B.A., and Villalón, C.M. (2016). Cardiovascular alterations during the interictal period in awake and pithed amygdala-kindled rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119, 165–172.
35. McIntosh, T.K., Head, V.A., and Faden, A.J. (1987). Alterations in regional concentrations of endogenous opioids following traumatic brain injury in the cat. *Brain Res.* 425, 225–233.
36. Faden, A.J., Demeadiuk, P., Panter, S.S., and Vink, R. (1989). The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244, 798–800.
37. Wang, X., Gao, X., Michalski, S., Zhao, S., and Chen, J. (2016). Traumatic brain injury severity affects neurogenesis in adult mouse hippocampus. *J. Neurotrauma* 33, 721–733.
38. An, C., Jiang, X., Pu, H., Hong, D., Zhang, W., Hu, X., and Gao, Y. (2016). Severity-dependent long-term spatial learning-memory impairment in a mouse model of traumatic brain injury. *Transl. Stroke Res.* 7, 512–520.
39. Ndode-Ekane, X.E., Santana-Gomez, C., Casillas-Espinosa, P.M., Ali, I., Brady, R.D., Smith, G., Andrade, P., Immonen, R., Puhakka, N., Hudson, M.R., Braine, E.L., Shultz, S.R., Staba, R.J., O'Brien, T.J., and Pitkanen, A. (2019). Harmonization of lateral fluid-percussion injury model production and post-injury monitoring in a preclinical multicenter biomarker discovery study on post-traumatic epileptogenesis. *Epilepsy Res.* 151, 7–16.
40. O'Bryant, A.J., Allred, R.P., Maldonado, M.A., Cormack, L.K., and Jones, T.A. (2011). Breeder and batch-dependent variability in the acquisition and performance of a motor skill in adult Long-Evans rats. *Behav. Brain Res.* 224, 112–120.
41. Krishnamoorthy, V., Rowhani-Rahbar, A., Chaikittisilpa, N., Gibbons, E.F., Rivara, F.P., Temkin, N.R., Quistberg, A., and Vavilala, M.S. (2017). Association of early hemodynamic profile and the development of systolic dysfunction following traumatic brain injury. *Neurocrit. Care* 26, 379–387.
42. Kimura, H. (2012). Physiological and pathophysiological functions of hydrogen sulfide. In: Hermann, A., Sitdikova, G.F., and Weiger, T.M. (eds). *Gasotransmitters: Physiology and Pathophysiology*. Berlin: Springer, pps. 71–98.
43. Soblosky, J.S., Matthews, M.A., Davidson, J.F., Tabor, S.L., and Carey, M.E. (1996). Traumatic brain injury of the forelimb and hindlimb sensorimotor areas in the rat: physiological, histological and behavioral correlates. *Behav. Brain Res.* 79, 79–92.
44. Sell, S.L., Johnson, K., Dewitt, D.S., and Prough, D.S. (2017). Persistent behavioral deficits in rats after parasagittal fluid percussion injury. *J. Neurotrauma* 34, 1086–1096.
45. Hammond, F.M., Corrigan, J.D., Ketchum, J.M., Malec, J.F., Dams-O'Connor, K., Hart, T., Novack, T.A., Bogner, J., Dahdah, M.N., and Whiteneck, G.G. (2019). Prevalence of medical and psychiatric comorbidities following traumatic brain injury. *J. Head Trauma Rehabil.* 34, E1–E10.
46. Eric Nyam, T.T., Ho, C.H., Chio, C.C., Lim, S.W., Wang, J.J., Chang, C.H., Kuo, J.R., and Wang, C.C. (2019). Traumatic brain injury increases the risk of major adverse cardiovascular and cerebrovascular events: a 13-year, population-based study. *World Neurosurg.* 122, e740–e753.

47. Larson, B.E., Stockwell, D.W., Boas, S., Andrews, T., Wellman, G.C., Lockette, W., and Freeman, K. (2012). Cardiac reactive oxygen species after traumatic brain injury. *J. Surg. Res.* 173, e73–e81.
48. Umemoto, Y., Patel, A., Huynh, T., and Chitravanshi, V.C. (2019). Wogonin attenuates the deleterious effects of traumatic brain injury in anesthetized Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.* 848, 121–130.
49. Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A.K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S.H., and Wang, R. (2008). H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 322, 587–590.
50. Zhong, G.Z., Chen, F.R., Cheng, Y.Q., Tang, C.S., and Du, J.B. (2003). The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J. Hypertens.* 21, 1879–1885.
51. Huang, P., Chen, S., Wang, Y., Liu, J., Yao, Q., Huang, Y., Li, H., Zhu, M., Wang, S., Li, L., Tang, C., Tao, Y., Yang, G., Du, J., and Jin, H. (2015). Down-regulated CBS/H<sub>2</sub>S pathway is involved in high-salt-induced hypertension in Dahl rats. *Nitric Oxide* 46, 192–203.
52. Goodwin, L.R., Francom, D., Dieken, F.P., Taylor, J.D., Warencya, M.W., Reiffenstein, R.J., and Dowling, G. (1989). Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J. Anal. Toxicol.* 13, 105–109.
53. Khademullah, C.S., and Ferguson, A. V. (2013). Depolarizing actions of hydrogen sulfide on hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *PLoS One* 8, e64495.
54. Malik, R., and Ferguson, A. V. (2016). Hydrogen sulfide depolarizes neurons in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Brain Res.* 1633, 1–9.
55. Duan, X.C., Liu, S.Y., Guo, R., Xiao, L., Xue, H.M., Guo, Q., Jin, S., and Wu, Y.M. (2015). Cystathionine- $\beta$ -synthase gene transfer into rostral ventrolateral medulla exacerbates hypertension via nitric oxide in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.* 28, 1106–1113.
56. Geng, B., Yang, J., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., Du, J., and Tang, C. (2004). H<sub>2</sub>S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 362–368.
57. Hosoki, R., Matsuki, N., and Kimura, H. (1997). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 527–31.
58. McCorry, L.K. (2007). Physiology of the autonomic nervous system. *Am. J. Pharm. Educ.* 71, 78.
59. Bishop, S., Dech, R., Baker, T., Butz, M., Aravinthan, K., and Neary, J.P. (2017). Parasympathetic baroreflexes and heart rate variability during acute stage of sport concussion recovery. *Brain Inj.* 31, 247–259.
60. Baguley, I.J., Heriseanu, R.E., Felmingham, K.L., and Cameron, I.D. (2006). Dysautonomia and heart rate variability following severe traumatic brain injury. *Brain Inj.* 20, 437–444.
61. Fernandez-Ortega, J.F., Baguley, I.J., Gates, T.A., Garcia-Caballero, M., Quesada-Garcia, J.G., and Prieto-Palomino, M.A. (2017). Catecholamines and paroxysmal sympathetic hyperactivity after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 34, 109–114.
62. Rosner, M.J., Newsome, H.H., and Becker, D.P. (1984). Mechanical brain injury: the sympathoadrenal response. *J. Neurosurg.* 61, 76–86.
63. Tümer, N., Svetlov, S., Whidden, M., Kirichenko, N., Prima, V., Erdos, B., Sherman, A., Kobeissy, F., Yezierski, R., Scarpace, P.J., Vierck, C., and Wang, K.K.W. (2013). Overpressure blast-wave induced brain injury elevates oxidative stress in the hypothalamus and catecholamine biosynthesis in the rat adrenal medulla. *Neurosci. Lett.* 544, 62–67.
64. Kobori, N., Hu, B., and Dash, P.K. (2011). Altered adrenergic receptor signaling following traumatic brain injury contributes to working memory dysfunction. *Neuroscience* 172, 293–302.
65. Levin, B.E., Pan, S., and Dunn-Meynell, A. (1994). Chronic alterations in rat brain  $\alpha$ -adrenoceptors following traumatic brain injury. *Restor. Neurol. Neurosci.* 7, 5–12.
66. Goddeau, R.P., Silverman, S.B., and Sims, J.R. (2007). Dexmedetomidine for the treatment of paroxysmal autonomic instability with dystonia. *Neurocrit. Care* 7, 217–220.
67. Wu, J., Vogel, T., Gao, X., Lin, B., Kulwin, C., and Chen, J. (2018). Neuroprotective effect of dexmedetomidine in a murine model of traumatic brain injury. *Sci. Rep.* 8, 4935.
68. Nissinen, J., Andrade, P., Natunen, T., Hiltunen, M., Malm, T., Kanninen, K., Soares, J.I., Shatillo, O., Sallinen, J., Ndode-Ekane, X.E., and Pitkänen, A. (2017). Disease-modifying effect of atipamezole in a model of post-traumatic epilepsy. *Epilepsy Res.* 136, 18–34.
69. Dominguez-Rodriguez, M., Drobny, H., Boehm, S., and Salzer, I. (2017). Electrophysiological investigation of the subcellular fine tuning of sympathetic neurons by hydrogen sulfide. *Front. Pharmacol.* 8, 522.
70. Ziolkowski, N., and Grover, A.K. (2010). Functional linkage as a direction for studies in oxidative stress: alpha-adrenergic receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 220–232.
71. Sun, G.C., Ho, W.Y., Chen, B.R., Cheng, P.W., Cheng, W.H., Hsu, M.C., Yeh, T.C., Hsiao, M., Lu, P.J., and Tseng, C.J. (2015). GPCR dimerization in brainstem nuclei contributes to the development of hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2507–2518.
72. Borroto-Escuela, D.O., Carlsson, J., Ambrogini, P., Narváez, M., Wydra, K., Tarakanov, A.O., Li, X., Millón, C., Ferraro, L., Cuppini, R., Tanganelli, S., Liu, F., Filip, M., Diaz-Cabiale, Z., and Fuxe, K. (2017). Understanding the role of GPCR heteroreceptor complexes in modulating the brain networks in health and disease. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 37.
73. Guo, Q., Jin, S., Wang, X.L., Wang, R., Xiao, L., He, R.R., and Wu, Y.M. (2011). Hydrogen sulfide in the rostral ventrolateral medulla inhibits sympathetic vasomotor tone through ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338, 458–465.



# Exogenous hydrogen sulfide restores CSE and CBS but no 3-MST protein expression in the hypothalamus and brainstem after severe traumatic brain injury

Saúl Huerta de la Cruz<sup>1</sup> · Erick J. Rodríguez-Palma<sup>2</sup> · Cindy L. Santiago-Castañeda<sup>1</sup> · Jesús H. Beltrán-Ornelas<sup>1</sup> · Araceli Sánchez-López<sup>1</sup> · Luisa Rocha<sup>1</sup> · David Centurión<sup>1</sup>

Received: 7 February 2022 / Accepted: 10 June 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

## Abstract

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is a gasotransmitter endogenously synthesized by cystathionine-γ-lyase (CSE), cystathionine-β-synthase (CBS), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) enzymes. H<sub>2</sub>S exogenous administration prevents the development of hemodynamic impairments after traumatic brain injury (TBI). Since the hypothalamus and the brainstem highly regulate the cardiovascular system, this study aimed to evaluate the effect of NaHS subchronic treatment on the changes of H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes in those brain areas after TBI and in physiological conditions. For that purpose, animals were submitted to a lateral fluid percussion injury, and the changes in CBS, CSE, and 3-MST protein expression were measured by western blot at days 1, 2, 3, 7, and 28 in the vehicle group, and 7 and 28 days after NaHS treatment. After severe TBI induction, we found a decrease in CBS and CSE protein expression in the hypothalamus and brainstem; meanwhile, 3-MST protein expression diminished only in the hypothalamus compared to the Sham group. Remarkably, i.p. daily injections of NaHS, an H<sub>2</sub>S donor, (3.1 mg/kg) during seven days: (1) restored CBS and CSE but no 3-MST protein expression in the hypothalamus at day 28 post-TBI; (2) reestablished only CSE in brainstem 7 and 28 days after TBI; and (3) did not modify H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes protein expression in uninjured animals. Mainly, our results show that the NaHS effect on CBS and CSE protein expression is observed in a time- and tissue-dependent manner with no effect on 3-MST expression, which may suggest a potential role of H<sub>2</sub>S synthesis in hypothalamus and brainstem impairments observed after TBI.

**Keywords** Hydrogen sulfide · Traumatic brain injury · Cystathionine-γ-lyase · Cystathionine-β-synthase · 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase

## Introduction

In the last few decades, hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) has been widely recognized for its role in several physiological and pathophysiological conditions. Initially considered as a toxic gas, H<sub>2</sub>S has now been established as the third gasotransmitter

along with nitric oxide and carbon monoxide (Wang 2002). H<sub>2</sub>S can be synthesized endogenously by: (1) non-enzymatic pathways through glucose, polysulfides, and sulfur-containing amino acids metabolism (Searcy and Lee 1998; Olson et al. 2013; Yang et al. 2019); and (2) enzymatic pathways that include cystathionine-γ-lyase (CSE), cystathionine-β-synthase

✉ David Centurión  
dcenturi@cinvestav.mx

Saúl Huerta de la Cruz  
saulhuerta29@hotmail.com

Erick J. Rodríguez-Palma  
ejosue26@hotmail.com

Cindy L. Santiago-Castañeda  
cindy\_2901@hotmail.com

Jesús H. Beltrán-Ornelas  
jesushernanbeltran@gmail.com

Araceli Sánchez-López  
asanchezl@cinvestav.mx

Luisa Rocha  
lrocha@cinvestav.mx

<sup>1</sup> Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Coapa, Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Neurobiology of Pain Laboratory, Departamento de Farmacobiología, Cinvestav, Sede Sur, Mexico City, Mexico

(CBS) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) enzymes. Among its effects, H<sub>2</sub>S has been implied in the modulation of the cardiovascular and nervous systems (Wang 2012). Indeed, it has been proposed that H<sub>2</sub>S exerts a potential therapeutic effect in animal models of neurodegenerative diseases such as Parkinson Disease (Kida et al. 2011), Alzheimer Disease (Giuliani et al. 2013), stroke (Gheibi et al. 2014; Liu et al. 2016), and traumatic brain injury (TBI) (Jiang et al. 2013; Xu et al. 2018). TBI is defined as a disruption in the brain triggered by an external physical force that may induce temporal or permanent disability in cognitive or motor function (Frieden et al. 2015). After TBI induction, it has been reported a decrease in plasmatic and cortical levels of H<sub>2</sub>S accompanied by a decreased in CBS enzyme messenger RNA (mRNA) and protein expression in the ipsilateral cortex and hippocampus (Zhang et al. 2013). Additionally, 3-MST dynamically changes after TBI in the injured cortex (Zhang et al. 2016). This evidence may suggest an impairment in H<sub>2</sub>S production after TBI, at least in cortex and hippocampus. On the other hand, it is well known that TBI induces changes in the cardiovascular system, including hypertension and major adverse cardiovascular and cerebrovascular events (Eric Nyam et al. 2019; Hammond et al. 2019). We have recently demonstrated that subchronic administration of NaHS, an H<sub>2</sub>S donor, prevents the development of hypertension by inhibiting the vasopressor sympathetic outflow (Huerta de la Cruz et al. 2022). Moreover, previous studies have shown that NaHS administration is able to induce CBS protein expression to (1) promote neuroprotection after intracerebral hemorrhage (Shan et al. 2019); and (2) induce pain in diabetic rats (Roa-Coria et al. 2019); which may suggest a positive regulation of exogenous H<sub>2</sub>S at least on CBS enzyme. Since the autonomic nervous system and the cardiovascular system are regulated in central structures such as hypothalamus and brainstem, this study aimed to evaluate the changes in H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes in both structures after TBI. Additionally, we hypothesized that NaHS subchronic treatment would restore the changes in H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes observed after TBI. These data could shed further light on H<sub>2</sub>S synthesis changes during TBI.

## Material and methods

### Animals

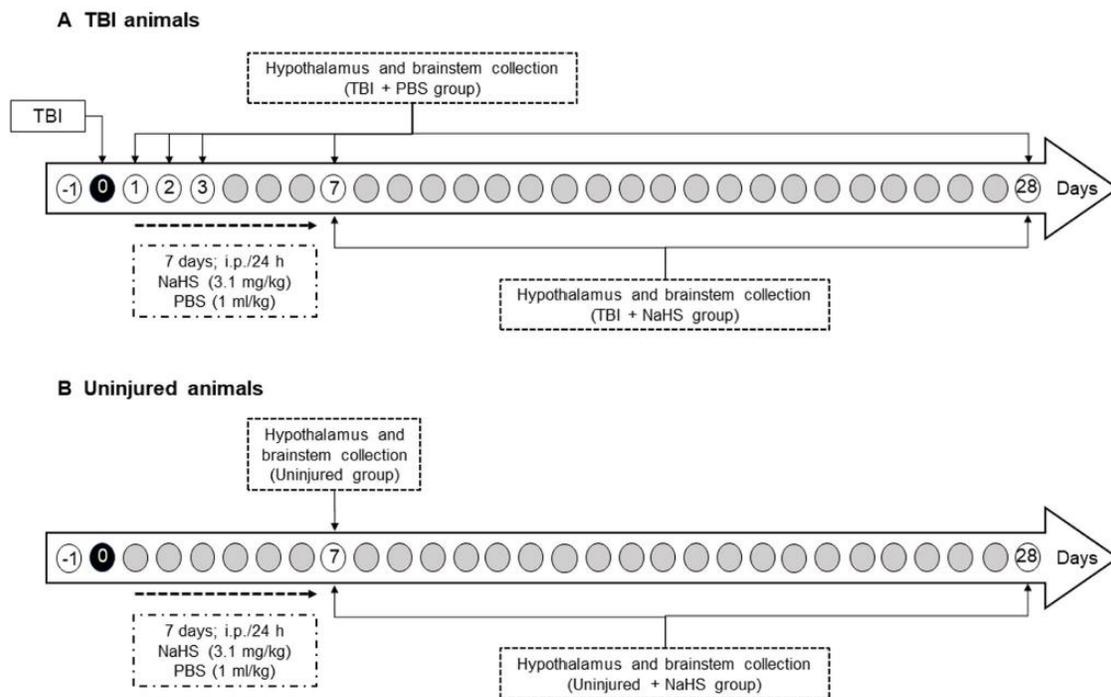
44 male Wistar rats (8 weeks old; 240–280 g) were used for this study. Animals were placed individually in acrylic cages under 12/12 h light–dark cycle and controlled humidity and temperature conditions (50% humidity, 22 ± 1 °C) with free access to food (LabDiet® 5008) and tap water. The animal procedures and protocols performed in this study followed the regulations established by the Mexican Official Norm for the Use and Welfare of Laboratory Animals

(NOM- 062-ZOO-1999) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in the USA (National Research Council of the National Academies 2011). All the procedures and protocols were approved by the Institutional Ethics Committee (Cicual-Cinvestav).

### Experimental groups

The experiments in this study were conceived to determine the impairments in protein expression of H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes after TBI. Moreover, the effect of NaHS subchronic treatment (for 7 days) on H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes protein expression was evaluated after TBI and in physiological conditions. For that purpose, the following experiments were performed (Fig. 1):

- (a) TBI+PBS group ( $n=20$ ). Animals underwent a severe TBI. These animals show measurable deficits in sensorimotor function and motor coordination, as well as significant cardiovascular impairments (Huerta de la Cruz et al. 2022). Thus, the neuroscore test was conducted one day before and two days after the TBI induction to confirm the outcome of severe TBI in the animals. Twenty-four h after trauma, rats were treated with i.p. phosphate buffer saline (PBS; 1 ml/kg; vehicle) daily for 7 days. Animals were anaesthetized with isoflurane (3%) and sacrificed by decapitation to collect the hypothalamus and the brainstem. Both tissues were collected at days 1, 2, 3, 7, and 28 ( $n=4$ , each) after TBI. The tissue was stored at -70 °C until further processing. A Western Blotting assay was performed to determine the time course of protein expression changes (Fig. 1A).
- (b) TBI + NaHS group ( $n=8$ ). Rats were handled as mentioned above for TBI+PBS group except that they received i.p. administration of NaHS (3.1 mg/kg) instead of PBS, and tissues were collected at days 7 and 28 post-TBI ( $n=4$ , each). NaHS (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was dissolved in PBS at pH 7.4 and 25 °C; new solutions were prepared every day (Fig. 1A).
- (c) Sham group ( $n=4$ ). Animals were manipulated as TBI+PBS group except that they did not receive the trauma, and tissues were collected on day 2 after TBI.
- (d) Uninjured + NaHS ( $n=8$ ). Animals in this group did not receive any experimental manipulation rather than i.p. administration of NaHS (3.1 mg/kg). Tissues were collected at days 7 and 28 after the first NaHS administration ( $n=4$ , each) (Fig. 1B).
- (e) Uninjured group ( $n=4$ ). Animals were handled as mentioned above for Uninjured + NaHS except that they received PBS instead of NaHS. Tissues were collected at day 7 after the first NaHS administration (Fig. 1B)



**Fig. 1** Timeline of the experimental design to determine the effects of NaHS subchronic administration on H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes expression in hypothalamus and brainstem after TBI and in uninjured animals. **A** Tissues were obtained at days 1, 2, 3, 7 and 28 post-TBI. PBS (TBI+PBS group) or NaHS (3.1 mg/kg; TBI+NaHS group) were

administered every 24 h after TBI induction for 7 days. **B** Tissues were obtained at day 7 after the first PBS administration for the uninjured group (vehicle), and at day 7 and 28 after the first NaHS administration for the uninjured group that received NaHS administrations at 3.1 mg/kg every 24 h for 7 days

### TBI induction

Animals were anaesthetized with ketamine (80 mg/kg, i.p.; Anestek®, PiSA Agropecuaria, Jal, Mexico) and xylazine (15 mg/kg, i.m.; Procin®, PiSA Agropecuaria, Jal, Mexico), and then positioned in a stereotaxic frame. The periosteum was removed after a sagittal incision was done in the midline. Later, a stainless-steel screw was attached in the skull over the frontal cortex to fix all the preparation. A 5 mm craniotomy was performed on the left hemisphere with a manual trephine (-5.0 mm to bregma and -4.0 mm to sagittal suture) to put a female plastic luer lock with tissue adhesive (VetBond 3 M Science. Applied to Life™) once the dura mater integrity was confirmed. After verifying no leakage, the luer lock and the screw were attached to the skull using dental acrylic. To induce the traumatic lesion, the animals were connected to an LFPI device (Am Science Instrument, Richmond, VA, USA) with a straight tip through the luer lock after 90 min of anaesthesia induction, as previously reported (McIntosh et al. 1989). The pulse pressure was transduced and measured in each animal.

After trauma induction, the dental acrylic shell was taken away to suture the incision. Finally, animals were housed in individual acrylic cages on heating pads to regulate body temperature and received tramadol (20 mg/kg, s.c.) to avoid surgery-induced pain. Animals submitted to a pulse pression of 2.6 to 3.6 atm were considered as severe TBI. This severity was confirmed with the neuroscore test 2 days post-TBI (except for the animals in the TBI+PBS group sacrificed 1-day post-TBI, which were evaluated 1-day post-TBI induction). Neuroscore test was conducted as previously described (Santiago-Castañeda et al. 2020; Huerta de la Cruz et al. 2022).

### Western blot

Western blot analysis was used to evaluate changes in CSE, CBS and 3-MST expression in hypothalamus and brainstem of sham, TBI+PBS, and TBI+NaHS rats. Animals were anaesthetized with isoflurane (3%) and sacrificed by decapitation to collect the hypothalamus and brainstem. Tissues were carefully excised and homogenized in ice-cold

cOmplete buffer (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 100- $\times$  1%, sodium deoxycholate 5%, and SDS 0.1%) which contains proteases inhibitors (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich; Cat. No. 4693159001). Later, homogenized samples were centrifuged at 14 000 rpm for 10 min at 4 °C. According to the insert instructions, the supernatant fraction was collected to measure total protein concentration with the Bradford method (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 1; Bio-Rad). A total of 50  $\mu$ g of protein was separated by denaturing in a 10% SDSS- polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for 90 min at 120 V. Proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane for 90 min at 70 V. Then, membranes were blocked for 80 min at room temperature with non-fat milk in TBS/Tween 0.1% at pH 7.4. After the blockade, membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against the enzymes CBS (mouse; 1:500; Cat. SC-133154; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), CSE (mouse; 1:1000; Cat. SC-365381; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and 3-MST (rabbit; 1:1000; Cat. HPA001240; Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).  $\beta$ -actin was used as load control to normalize protein expression levels. (anti- $\beta$ -actin; 1:10,000, Cat. GTX5512; GeneTex, Irvine, CA). The following day, membranes were washed and then incubated with the corresponding secondary antibody for 2 h at room temperature (anti-mouse; 1:7000; Cat. GTX213111-01; GeneTex, Irvine, CA or anti-rabbit; 1:5000; Cat. GTX213110-01; GeneTex, Irvine, CA). Protein signals were detected using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Billerica, MA). Bands were visualized using a ChemiDoc™ XRS + Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA) and quantified by densitometry using an image analysis software (Image Lab Software Version 5.2.1, Bio-Rad, Hercules, CA). After each protein detection, membranes were stripped using a stripping buffer (Glycine, 200 mM; SDS, 0.1%; Tween 20, 1%; pH 2.2). The full images of the western blot of the hypothalamus and the brainstem from TBI animals can be found in Supplementary Figs. S1 and S2, respectively. Since we found the expression of the proteins in the expected molecular weight in both brain structures, we decided to crop the membranes and incubate them separately with the corresponding antibody according to their molecular weight to minimize the use of the stripping protocol.

**Data presentation and statistical analysis**

All figures are presented in boxes showing the median and the 25th and 75th quartiles and whiskers that represent minimum and maximal values. The data in Table 1 are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. The differences in protein expression between days in TBI + PBS group were assessed by One Way analysis of variance (ANOVA) with a Dunnet post-hoc test

**Table 1** Information of the fluid percussion and the neuroscore test in independent experimental groups

	Days post-TBI														
	1			2			3			7			28		
	TBI + PBS		NS (points)	TBI + PBS		NS (points)	TBI + PBS		NS (points)	TBI + PBS		NS (points)	TBI + NaHS		NS (points)
Pressure (atm)	2.86	13.04	3.00	14.50	2.82	11.00	2.99	12.50	2.97	15.67	2.92	13.50	2.87	15.13	
SD	0.03	2.08	0.46	3.42	0.74	6.68	0.51	3.11	0.58	0.87	0.41	1.00	0.11	1.49	
SEM	0.01	1.04	0.23	1.97	0.37	3.34	0.26	1.55	0.29	0.44	0.20	0.50	0.05	0.75	

The evaluations were performed in independent groups for each day. In all the experimental groups, the animals obtained 26–28 points before the TBI induction. PBS, phosphate buffer saline (1 ml/kg); NaHS, sodium hydrosulfide (3.1 mg/kg); NS, neuroscore 2 days after TBI; atm, atmospheres; SD, standard deviation; SEM, standard error of the mean. Values represent four animals per group

using the sham group as control. The differences between pulse pressure and neuroscore point among the experimental groups and the effect of NaHS subchronic treatment were evaluated by Tukey's test once a One-Way ANOVA reached statistical significance. Statistical analysis and figures were performed with GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA). Statistical significance was accepted when  $p < 0.05$ .

## Results

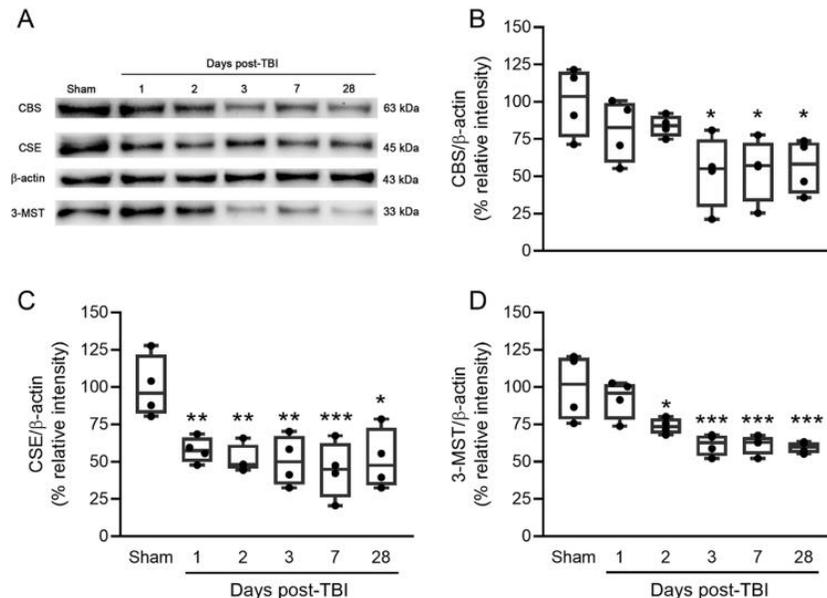
To evaluate the potential effect of NaHS subchronic treatment in H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes in the TBI animals, the changes induced by the traumatic lesion in the protein expression of CBS, CSE, and 3-MST at days 1, 2, 3, 7, and 28 after TBI were determined. The data of fluid percussion in TBI+PBS and TBI+NaHS groups at the different days of evaluation are shown in Table 1. In the TBI+PBS groups, TBI was induced by applying a fluid percussion of: (1) day 1,  $2.86 \pm 0.01$  atm; (2) day 2,  $3.00 \pm 0.23$ ; (3) day 3,  $2.82 \pm 0.37$ ; (4) day 7,  $2.99 \pm 0.26$ ; and (5) day 28,  $2.92 \pm 0.20$  in independent groups for each day of evaluation. Moreover, treated animals in the TBI+NaHS group were submitted to a fluid percussion of  $2.97 \pm 0.29$  and  $2.87 \pm 0.05$  for days 7 and 28 post-TBI, respectively, in independent groups. It can be observed that all animals underwent a severe TBI, and no significant differences were found among the experimental groups in fluid percussion pressure ( $F_{(6,21)} = 0.09293$ ;  $p = 0.9964$ ; Table 1) or neuroscore points ( $F_{(6,21)} = 1.033$ ;

$p = 0.4322$ ; Table 1) which confirm the outcome of severe TBI in the animals, as previously described (Santiago-Castañeda et al. 2020; Segovia-Oropeza et al. 2020). In all the experimental groups, the animals obtained 26–28 points before the TBI induction, as previously reported (Huerta de la Cruz et al. 2022). Animals with less than that punctuation were excluded from the study.

### NaHS treatment restores CBS and CSE but no 3-MST protein expression after TBI in the hypothalamus

We assessed whether H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes changed after TBI in central structures that regulate cardiovascular system. In this sense, in the hypothalamus of animals submitted to a severe TBI, a significant decrease was found in: (1) CBS enzyme expression ( $F_{(5,18)} = 3.744$ ;  $p = 0.0169$ ; Fig. 2B) from 3 days and up to 28 days after TBI induction (day 3, 47%,  $p = 0.0165$ ; day 7, 46%,  $p = 0.02$ ; day 28, 44%,  $p = 0.275$ ); (2) CSE enzyme expression ( $F_{(5,18)} = 5.930$ ;  $p = 0.0021$ ; Fig. 2C) at every day of evaluation (day 1, 42%,  $p = 0.0094$ ; day 2, 49%,  $p = 0.0030$ ; day 3, 50%,  $p = 0.0025$ ; day 7, 56%,  $p = 0.0008$ ; day 28, 49%,  $p = 0.0029$ ); and (3) 3-MST enzyme expression ( $F_{(5,18)} = 9.039$ ;  $p = 0.0002$ ; Fig. 2C) since day 2 post-TBI, which was maintained to day 28 post-TBI (day 2, 27%,  $p = 0.0208$ ; day 3, 39%,  $p = 0.0008$ ; day 7, 39%,  $p = 0.0008$ ; day 28, 41%,  $p = 0.0005$ ) when compared to Sham group. Once we determined that the changes were observed up to 28 days, we decided to evaluate the effect of NaHS subchronic treatment at day 7 and 28 after TBI. Interestingly, as depicted in Fig. 3, NaHS treatment

**Fig. 2** H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes protein expression in the hypothalamus after TBI induction. **A** Representative blot of the time course of CBS, CSE and 3-MST expression after TBI. Time course of: **(B)** CBS, **(C)** CSE and **(D)** 3-MST protein expression after TBI (1, 2, 3, 7, and 28 days post-TBI). Animals in the Sham group show a basal expression of CBS, CSE and 3-MST enzymes. In contrast, there is a significant decrease in TBI+PBS group in the expression of CBS (3, 7, and 28 days post-TBI), CSE (1, 2, 3, 7, and 28 days post-TBI) and 3-MST (2, 3, 7, and 28 days post-TBI).  $*$ ,  $p < 0.05$ ;  $**$ ,  $p < 0.01$ ;  $***$ ,  $p < 0.001$  vs. Sham group



significantly restored CBS and CSE protein expression 28 days (CBS,  $p = 0.0002$ , Fig. 3B; CSE,  $p = 0.0273$ , Fig. 3C) but not at day 7 post-TBI (CBS,  $p = 0.8876$ , Fig. 3B; CSE,  $p = 0.7095$ , Fig. 3C). Lastly, NaHS failed to restore 3-MST enzyme changes induced by TBI (7 days,  $p = 0.9028$ ; 28 days,  $p = 0.8929$ ; Fig. 3D).

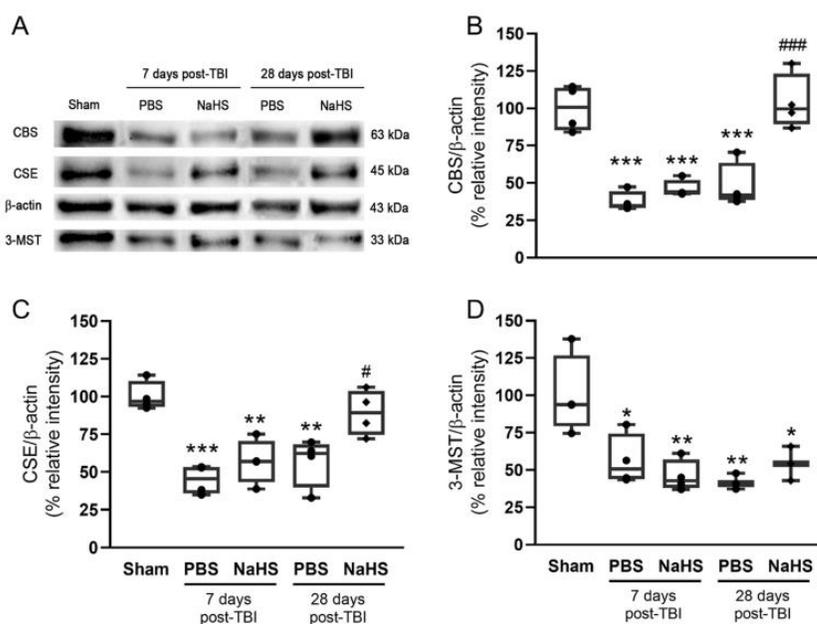
### NaHS treatment only restores CSE protein expression after TBI in the brainstem

Since the brainstem is a key regulator of autonomic nervous system, we decided to evaluate the changes in H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes after the trauma induction. Following trauma induction, we found a decrease in CBS expression ( $F_{(5,18)} = 11.68$ ;  $p < 0.0001$ ; Fig. 4B) from day 2 to 28 after TBI (day 2, 28%,  $p = 0.0078$ ; day 3, 46%,  $p < 0.0001$ ; day 7, 41%,  $p = 0.0002$ ; day 28, 47%,  $p < 0.0001$ ). This decrease was accompanied by a reduction in CSE expression ( $F_{(5,18)} = 11.68$ ;  $p < 0.0001$ ; Fig. 4C) at every day of evaluation post-TBI (day 1, 64%,  $p < 0.0001$ ; day 2, 63%,  $p < 0.0001$ ; day 3, 60%,  $p < 0.0001$ ; day 7, 52%,  $p = 0.0004$ ; day 28, 60%,  $p < 0.0001$ ) with no significant changes in 3-MST expression ( $F_{(5,18)} = 0.2407$ ;  $p = 0.9391$ ;

Fig. 4D) in brainstem. After NaHS treatment, CBS and 3-MST expression remained unchanged at day 7 (CBS,  $p = 0.9666$ , Fig. 5B; 3-MST,  $p = 0.2800$ , Fig. 5D) and day 28 (CBS,  $p = 0.4930$ , Fig. 5B; 3-MST,  $p = 0.8620$ , Fig. 5D) post-TBI when compared to TBI + PBS group. Surprisingly, NaHS administration was able to prevent the decreased in CSE expression induced by TBI at day 7 and 28 (7 days,  $p = 0.0036$ ; 28 days,  $p = 0.0009$ ; Fig. 5C).

### NaHS treatment did not modify H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes protein expression in the hypothalamus and brainstem in uninjured animals

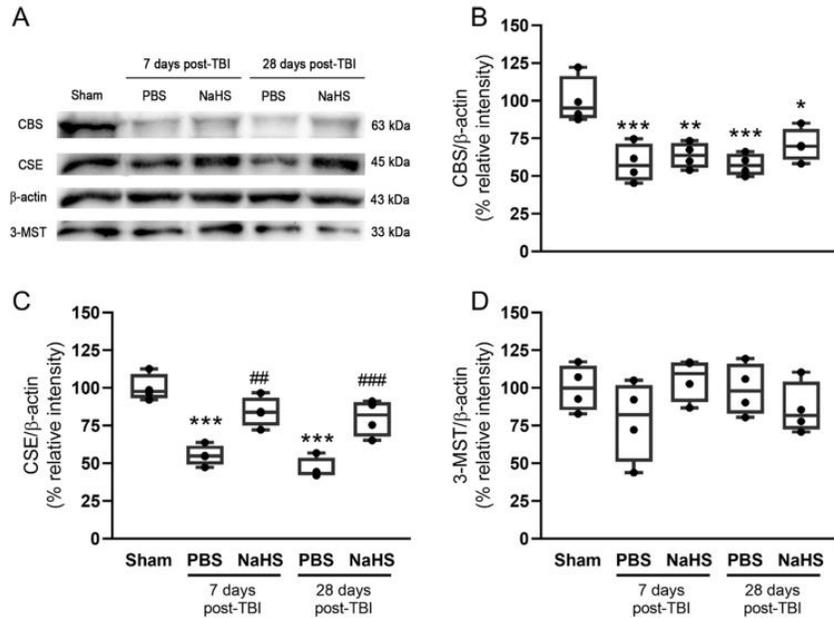
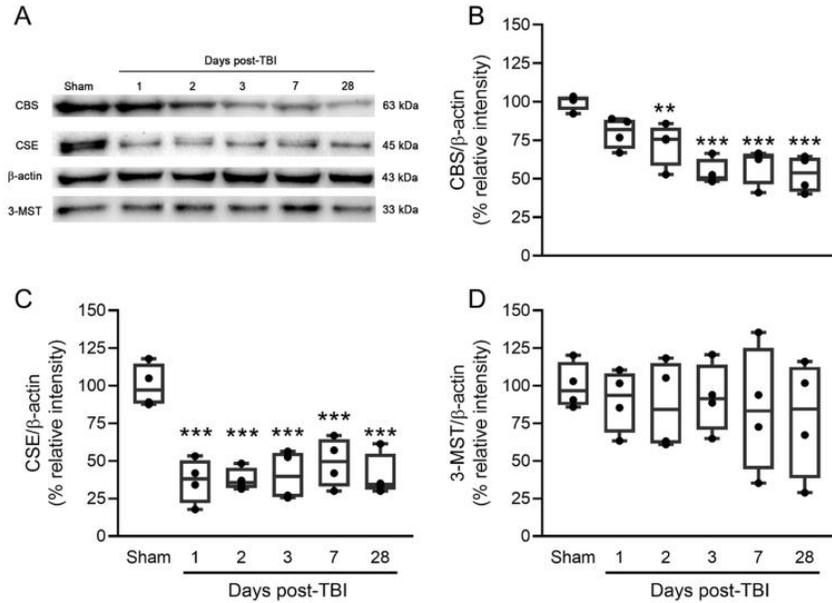
Once we found that NaHS subchronic treatment restored the protein expression of the H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes in TBI animals, we decided to test whether this regulation could be also observed in uninjured animals. We found that NaHS treatment did not modify CBS, CSE or 3-MST protein expression in the hypothalamus of the rats that did not underwent to any kind of injury at day 7 (CBS,  $p = 0.9384$ , Fig. 6B; CSE,  $p = 0.9961$ , Fig. 6B; 3-MST,  $p = 0.9043$ , Fig. 6D) or day 28 (CBS,  $p = 0.9980$ , Fig. 6B; CSE,  $p = 0.3175$ , Fig. 6B; 3-MST,  $p = 0.4395$ , Fig. 6D) after



**Fig. 3** Effect of subchronic treatment with sodium hydrosulfide (NaHS) on H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes expression changes in the hypothalamus. **A** Representative blot of CBS, CSE and 3-MST expression after TBI in treated animals (TBI+NaHS 3.1 mg/kg). Time course of: **(B)** CBS, **(C)** CSE and **(D)** 3-MST protein expression in TBI+NaHS group (7, and 28 days post-TBI). Animals in the Sham group show a basal expression of CBS, CSE and 3-MST

enzymes which is decreased in the TBI+PBS groups at days 7 and 28. In marked contrast, animals of the TBI+NaHS group showed similar CBS and CSE expression to those of the sham group at day 28 but not at day 7 post-TBI. NaHS treatment did not show any effect on 3-MST expression in the TBI+NaHS group. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. Sham group. #,  $p < 0.05$ ; ###,  $p < 0.001$  vs. PBS group

**Fig. 4** H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes protein expression in the brainstem after TBI. **A** Representative blot of the time course of CBS, CSE and 3-MST expression after TBI. Time course of: **(B)** CBS, **(C)** CSE and **(D)** 3-MST protein expression in the brainstem after TBI (1, 2, 3, 7, and 28 days post-TBI). Brainstem obtained from animals in the Sham group show a basal expression of CBS, CSE and 3-MST enzymes. In contrast, there is a significant decrease in TBI+PBS group in the expression of CBS (2, 3, 7, and 28 days post-TBI), CSE (1, 2, 3, 7, and 28 days post-TBI) with no changes in 3-MST protein expression. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. Sham group



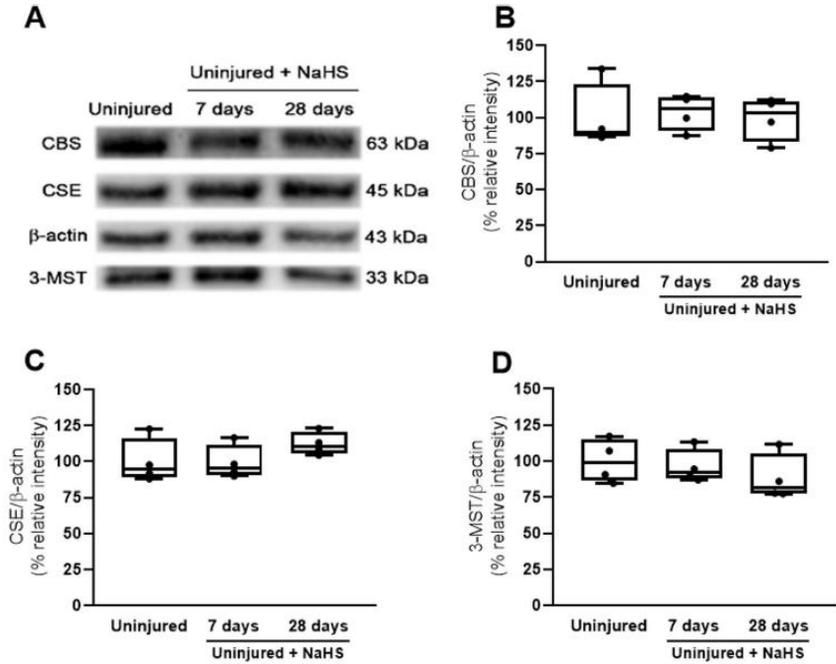
**Fig. 5** Effect of subchronic treatment with sodium hydrosulfide (NaHS) on H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes expression changes in the brainstem. **A** Representative blot of CBS, CSE and 3-MST expression after TBI in treated animals (TBI+NaHS 3.1 mg/kg). Time course of: **(B)** CBS, **(C)** CSE and **(D)** 3-MST protein expression in TBI+NaHS group (7, and 28 days post-TBI). Animals in the Sham group show a basal expression of CBS, CSE and 3-MST enzymes.

CBS and CSE but not 3-MST expression is decreased in the TBI+PBS groups at days 7 and 28. In marked contrast, animals of the TBI+NaHS group showed similar CSE expression to those of the sham group at days 7 and 28 post-TBI. NaHS treatment did not show any effect on CBS or 3-MST expression in the TBI+NaHS group. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  vs. Sham group. ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$  vs. PBS group

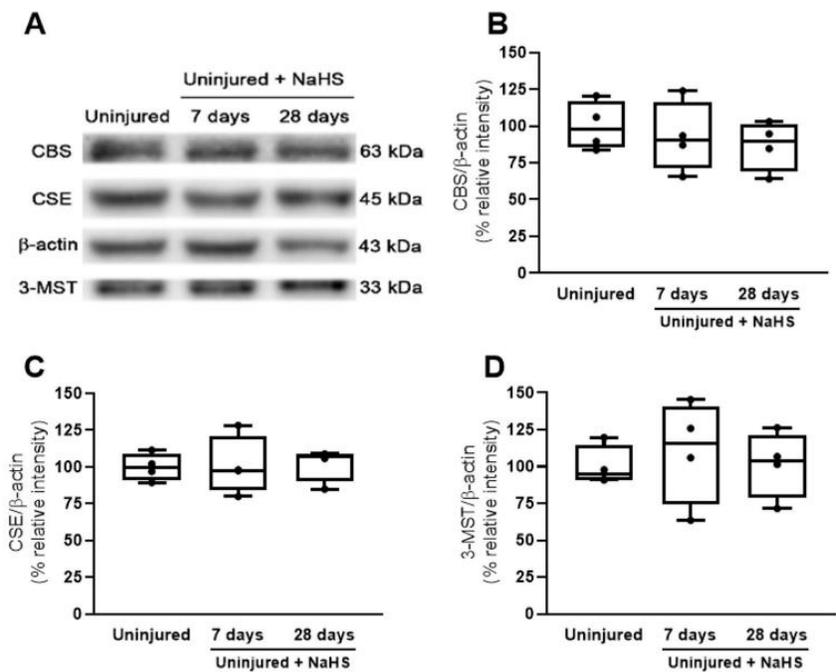
the first NaHS administration. Furthermore, we did not find any change on the brainstem of uninjured rats at day 7 (CBS,  $p=0.8133$ , Fig. 7B; CSE,  $p=0.9938$ , Fig. 7B; 3-MST,

$p=0.7962$ , Fig. 7D) or day 28 (CBS,  $p=0.5459$ , Fig. 7B; CSE,  $p=0.9723$ , Fig. 7B; 3-MST,  $p=0.9944$ , Fig. 7D) after the first NaHS administration.

**Fig. 6** Effect of subchronic treatment with sodium hydrosulfide (NaHS) on H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes expression in the hypothalamus from uninjured animals. **A** Representative blot of the effect of NaHS treatment (3.1 mg/kg) on CBS, CSE and 3-MST expression in uninjured animals. Time course of: **(B)** CBS, **(C)** CSE and **(D)** 3-MST protein expression in uninjured + NaHS group (7, and 28 days after the first NaHS administration). Animals in the uninjured group show a basal expression of CBS, CSE and 3-MST enzymes. NaHS treatment did not show any effect on the enzymes expression in the uninjured + NaHS group



**Fig. 7** Effect of subchronic treatment with sodium hydrosulfide (NaHS) on H<sub>2</sub>S synthesizing enzymes expression in the brainstem from uninjured animals. **A** Representative blot of the effect of NaHS treatment (3.1 mg/kg) on CBS, CSE and 3-MST expression in the brainstem from uninjured animals. Time course of: **(B)** CBS, **(C)** CSE and **(D)** 3-MST protein expression in uninjured + NaHS group (7, and 28 days after the first NaHS administration). Animals in the uninjured group show a basal expression of CBS, CSE and 3-MST enzymes. NaHS treatment did not show any effect on the enzymes expression in the uninjured + NaHS group



## Discussion

TBI is a complex pathological condition since it may trigger several phenomena such as neuronal loss (Santiago-Castañeda et al. 2020), inflammation (Lozano et al. 2015), mitochondrial and autonomic dysfunction (Jiang et al. 2013; Goldstein et al. 2017), edema (Kaur and Sharma 2017), and hyperexcitability (Segovia-Oropeza et al. 2020). Nowadays, important advances in understanding TBI processes have been made; however, there are no accurate treatments that may prevent the progression of TBI lesions. In this sense, gasotransmitters have gained particular attention as potential therapeutic agents for treating neurodegenerative diseases including TBI (Che et al. 2018).

Indeed, over the last decade, it has been shown that H<sub>2</sub>S donors treatment protects against TBI-induced impairments in spatial memory (Karimi et al. 2017), blood–brain barrier (Jiang et al. 2013), and the cardiovascular system (Huerta de la Cruz et al. 2022). Because the hypothalamus and the brainstem highly regulate the cardiovascular system, we decided to explore whether the TBI could impact H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes in that brain areas. We found that CBS, CSE, and 3-MST enzymes are expressed in the tissue obtained from the Sham group. According to our findings, previous studies have reported the presence of mRNA (Moustafa 2021) and protein expression of CBS, CSE, and 3-MST enzymes in the hypothalamus (Nogueira et al. 2017; Coletti et al. 2019) and the brainstem (Li et al. 2013; Duan et al. 2015; Fouda et al. 2018) obtained from control animals.

On the other hand, it has been reported that CBS and 3-MST enzymes expression is altered in the cortex and the hippocampus of animals submitted to a TBI (Zhang et al. 2013, 2016). Interestingly, the results of the present study show, for the first time, that TBI induces a decrease of: (1) CBS, CSE, and 3-MST enzymes in the hypothalamus; and (2) CBS and CSE in the brainstem. Remarkably, those changes occurred at different days post-TBI for each enzyme (See Figs. 2 and 4). Moreover, our findings differ in temporality from previous studies in the cortex and hippocampus (Zhang et al. 2013, 2016), which may suggest that the changes in the expression of enzymes depend upon the assessed tissue. The role of these enzymes, and therefore H<sub>2</sub>S function, within those brain tissues controlling the cardiovascular system, are still controversial. However, it has been shown that CBS inhibition aminooxyacetic acid (AOA) and hydroxylamine (HA) in the posterior hypothalamus of normotensive rats increases MAP and HR (Dawe et al. 2008); meanwhile, the same experimental approach performed in the RVLM of normotensive rats increases sympathetic nerve activity along with the changes in the hemodynamic variables (Duan et al. 2015). Furthermore,

in hypertensive animals, the inhibition of CBS activity with HA in the RVLM produces an increase in MAP (Yu et al. 2015) whereas, in the PVN, the administration of the CBS inhibitor (HA) induces an increase not only in the MAP and HR but also in plasmatic norepinephrine levels (Liang et al. 2017). On the other hand, NaHS administration in the posterior hypothalamus decreases MAP and HR (Dawe et al. 2008), as well as sympathetic nerve activity when administered in the RVLM (Guo et al. 2011). Regarding the CSE, the restoration of this enzyme activity in the RVLM mediates moxonidine-induced sympathoinhibition (Fouda et al. 2018). Additionally, we have recently shown that TBI increases blood pressure and sympathetic hyperactivity from 7 to 28 days post-TBI (Huerta de la Cruz et al. 2022). Thus, our results may suggest that the impairments in hemodynamic variables and sympathetic activity observed after TBI could be mediated by changes in H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes in the hypothalamus and the brainstem.

As many other proteins, H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes expression is highly regulated by transcriptional mechanisms (Yang et al. 2011; Hassan et al. 2012; Guo et al. 2014) and several post-translational modifications including phosphorylation (D’Emmanuele di Villa Bianca et al. 2016; Renga et al. 2015), sumoylation (Agrawal and Banerjee 2008), and even sulphydration (Mustafa et al. 2009). Because H<sub>2</sub>S may induce sulphydration and could regulate its synthesis per se, we decided to test the effect of NaHS treatment on H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes changes observed at days 7 and 28 post-TBI. Surprisingly, our results show that exogenous H<sub>2</sub>S restored the expression of CBS and CSE enzymes in the hypothalamus 28 but not 7 days after TBI induction, which may suggest a long-term effect after NaHS administration. Furthermore, we found a reestablishment only in CSE expression at days 7 and 28 post-TBI in the brainstem. Lastly, neither in the hypothalamus nor brainstem NaHS treatment induces a significant change in 3-MST enzyme expression. These data suggest that the effect of NaHS on H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes differs in temporality and the evaluated tissue. According to our findings, it has been recently shown that NaHS administration induces the expression of (1) CBS enzyme after intracerebral hemorrhage (Shan et al. 2019) and diabetes induction in rats (Roa-Coria et al. 2019); and (2) CSE enzyme in diabetic rats (Fouda et al. 2018). However, the effect of exogenous H<sub>2</sub>S on 3-MST expression is still controversial since H<sub>2</sub>S donors administration: (1) induces a decrease in 3-MST mRNA expression in the hypothalamus (Coletti et al. 2019); and (2) does not change 3-MST mRNA in fibroblasts (Hourihan et al. 2013) or protein expression in the striatum after intracerebral hemorrhage (Shan et al. 2019).

On the other hand, it has been previously demonstrated that NaHS at 3.1 mg/kg during 16 weeks restored CSE expression in the renal arteries from hypertensive rats with no significant effect in the tissue from control rats (Xiao et al. 2016). Conversely, NaHS treatment at 0.5 mg/kg for 14 days increases mRNA expression of CBS in the striatum under physiological and pathological conditions (Mohammed and Mansour 2021). Moreover, NaHS treatment during 2 weeks at 2.8 mg/kg and 1.4 mg/kg increases CSE and 3-MST protein expression whereas did not significantly modify CBS expression in the myocardium from control rats (Li et al. 2016). Based on these lines of evidence, the effect of exogenous administration of H<sub>2</sub>S on the endogenous H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes expression seems to be controversial. In this sense, our results show that there is no significant effect of NaHS subchronic treatment on the protein expression of H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes in the hypothalamus or brainstem from uninjured animals, which may suggest that H<sub>2</sub>S does not regulate endogenous H<sub>2</sub>S synthesis under physiological conditions in both brain structures.

The mechanisms that lead to an increase in CBS and CSE enzymes after exogenous H<sub>2</sub>S administration have been poorly explored. Nevertheless, as previously mentioned, the expression of H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes is regulated by transcriptional factors such as the nuclear factor erythroid-2-related factor2 (Nrf2) (Hassan et al. 2012). At the same time, it is well known that H<sub>2</sub>S regulates Nrf2 activity through the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) sulfhydration to decrease oxidative stress (Corsello et al. 2018). Therefore, it is possible that exogenous H<sub>2</sub>S binds to Keap1, inducing Nrf2 dissociation and, consequently, enhancing Nrf2 nuclear translocation to promote the expression of CBS and CSE enzymes, as previously suggested in *in vitro* experiments where Nrf2 can regulate CBS and CSE mRNA expression (Hourihan et al. 2013). Moreover, previous findings have shown that H<sub>2</sub>S induces neuroprotection after cell damage by modulating the PI3K/Akt/Nrf2 signaling (Zhang et al. 2019), suggesting a key role of Nrf2 and H<sub>2</sub>S after brain injury. However, future experiments addressing mechanistic insights about this are required.

To the best of our knowledge, this is the first study that (1) assesses changes in CSE enzyme protein expression in brain tissue after TBI; (2) shows impairments in H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes in the hypothalamic and brainstem tissue after TBI; and (3) evaluates the effect of NaHS on CBS, CSE, and 3-MST enzymes after TBI. Nevertheless, it should be admitted that the methodological approach used in this study does not allow the identification of cell-specificity regarding the changes observed in H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes. Therefore, more studies are required to determine the effect of TBI on

H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes protein expression on different cell types in the brain. Lastly, we should admit that in the present study we did not measure H<sub>2</sub>S levels in the hypothalamus or brainstem. However, it has been previously demonstrated that *i.p.* NaHS administration (1–10 mg/kg) significantly increases H<sub>2</sub>S levels in the plasma (Ning et al. 2013; Li et al. 2016) and brain areas such as the cortex and the hippocampus (Kumar et al. 2020). Particularly, in a rat model of moderate TBI, a single NaHS administration (3 mg/kg; *i.p.*) 5 min after TBI induction restores cortical levels of H<sub>2</sub>S (Jiang et al. 2013). Therefore, it could be assumed that our subchronic treatment with NaHS (3 mg/kg; *i.p.*) induces an increase in plasmatic and brain (hypothalamus and brainstem) levels of H<sub>2</sub>S that allows the regulation of enzyme expression. However, experiments regarding this situation are still required.

## Conclusion

Taken together, our results show that there is a decrease in CBS, CSE (hypothalamus and brainstem), and 3-MST (hypothalamus) after TBI. Moreover, NaHS subchronic treatment restores CBS and CSE enzymes expression in a time- and tissue-dependent manner with no effect on 3-MST expression in TBI animals but not in uninjured animals. These results may suggest (1) that exogenous H<sub>2</sub>S regulates endogenous H<sub>2</sub>S-synthesizing enzymes under TBI but not in physiological conditions; and (2) a potential role of H<sub>2</sub>S synthesis deficiency in the hypothalamus and brainstem impairments observed after TBI.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01033-1>.

**Author contribution** Huerta de la Cruz S, Rocha L and Centurion D conceived the original idea. Material preparation, data collection and analysis were performed by Huerta de la Cruz S, Rodríguez-Palma EJ, Santiago-Castañeda CL, Beltrán-Ornelas JH and Sánchez-López A. The first draft of the manuscript was written by Huerta de la Cruz S and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** The National Council for Science and Technology (CONACyT) supported this work [Grant No. 252702].

**Data availability** The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

## References

- Agrawal N, Banerjee R (2008) Human polycomb 2 protein is a SUMO E3 ligase and alleviates substrate-induced inhibition of cystathionine  $\beta$ -synthase sumoylation. *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004032>
- Che X, Fang Y, Si X et al (2018) The role of gaseous molecules in traumatic brain injury: An updated review. *Front Neurosci* 12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00392>
- Coletti R, de Lima JBM, Vechiato FMV et al (2019) Nitric oxide acutely modulates hypothalamic and neurohypophyseal carbon monoxide and hydrogen sulphide production to control vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release in rats. *J Neuroendocrinol* 31. <https://doi.org/10.1111/jne.12686>
- Corsello T, Komaravelli N, Casola A (2018) Role of hydrogen sulfide in nrf2-and sirtuin-dependent maintenance of cellular redox balance. *Antioxidants* 7. <https://doi.org/10.3390/antiox7100129>
- Dawe GS, Han SP, Bian JS, Moore PK (2008) Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience* 152:169–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.12.008>
- Duan XC, Guo R, Liu SY et al (2015) Gene transfer of cystathionine  $\beta$ -synthase into RVLM increases hydrogen sulfide-mediated suppression of sympathetic outflow via KATP channel in normotensive rats. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 308:H603–H611. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00693.2014>
- Eric Nyam TT, Ho CH, Chio CC et al (2019) Traumatic Brain Injury Increases the Risk of Major Adverse Cardiovascular and Cerebrovascular Events: A 13-Year, Population-Based Study. *World Neurosurg* 122:e740–e753. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.10.130>
- Fouda MA, El-Sayed SS, Abdel-Rahman AA (2018) Restoration of rostral ventrolateral medulla cystathionine-g lyase activity underlies moxonidine-Evoked neuroprotection and sympathoinhibition in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 364:170–178. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.243865>
- Frieden TR, Houry D, Baldwin G (2015) Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation. *CDC NIH Rep to Congr* 1–74. <https://doi.org/10.3171/2009.10.JNS091500>
- Gheibi S, Aboutaleb N, Khaksari M et al (2014) Hydrogen sulfide protects the brain against ischemic reperfusion injury in a transient model of focal cerebral ischemia. *J Mol Neurosci* 54:264–270. <https://doi.org/10.1007/S12031-014-0284-9>
- Giuliani D, Ottani A, Zaffe D et al (2013) Hydrogen sulfide slows down progression of experimental Alzheimer's disease by targeting multiple pathophysiological mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* 104:82–91. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.05.006>
- Goldstein B, Towell D, Lai S et al (2017) Uncoupling of the autonomic and cardiovascular systems in acute brain injury. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 275:R1287–R1292. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.4.r1287>
- Guo Q, Jin S, Wang XL et al (2011) Hydrogen sulfide in the rostral ventrolateral medulla inhibits sympathetic vasomotor tone through ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels. *J Pharmacol Exp Ther* 338:458–465. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.180711>
- Guo C, Liang F, Shah Masood W, Yan X (2014) Hydrogen sulfide protected gastric epithelial cell from ischemia/reperfusion injury by Keap1 s-sulfhydration, MAPK dependent anti-apoptosis and NF- $\kappa$ B dependent anti-inflammation pathway. *Eur J Pharmacol* 725:70–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.009>
- Hammond FM, Corrigan JD, Ketchum JM et al (2019) Prevalence of medical and psychiatric comorbidities following traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 34:1. <https://doi.org/10.1097/htr.0000000000000465>
- Hassan MI, Boosen M, Schaefer L et al (2012) Platelet-derived growth factor-BB induces cystathionine  $\gamma$ -lyase expression in rat mesangial cells via a redox-dependent mechanism. *Br J Pharmacol* 166:2231–2242. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01949.x>
- Hourihan JM, Kenna JG, Hayes JD (2013) The gasotransmitter hydrogen sulfide induces Nrf2-target genes by inactivating the Keap1 ubiquitin ligase substrate adaptor through formation of a disulfide bond between Cys-226 and Cys-613. *Antioxidants Redox Signal* 19:465–481. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4944>
- Huerta de la Cruz S, Rocha L, Santiago-Castañeda C et al (2022) Hydrogen Sulfide Subchronic Treatment Improves Hypertension Induced by Traumatic Brain Injury in Rats through Vasopressor Sympathetic Outflow Inhibition. *J Neurotrauma* 39:1–15. <https://doi.org/10.1089/neu.2020.7552>
- Jiang X, Huang Y, Lin W et al (2013) Protective effects of hydrogen sulfide in a rat model of traumatic brain injury via activation of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reduction of oxidative stress. *J Surg Res* 184. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.03.067>
- Karimi SA, Hosseinmardi N, Janahmadi M et al (2017) The protective effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on traumatic brain injury (TBI) induced memory deficits in rats. *Brain Res Bull* 134:177–182. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.07.014>
- Kaur P, Sharma S (2017) Recent advances in pathophysiology of traumatic brain injury. *Curr Neuropharmacol* 15:1224–1238. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170613083606>
- Kida K, Yamada M, Tokuda K et al (2011) Inhaled hydrogen sulfide prevents neurodegeneration and movement disorder in a mouse model of Parkinson's disease. *Antioxidants Redox Signal* 15:343–352. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3671>
- Kumar M, Arora P, Sandhir R (2020) Hydrogen Sulfide Reverses LPS-Induced Behavioral Deficits by Suppressing Microglial Activation and Promoting M2 Polarization. *J Neuroimmune Pharmacol* 16(2):483–499. <https://doi.org/10.1007/S11481-020-09920-Z>
- Li M, Nie L, Hu Y et al (2013) Chronic intermittent hypoxia promotes expression of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in adult rat medulla oblongata. *Auton Neurosci Basic Clin* 179:84–89. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2013.08.066>
- Li N, Wang MJ, Jin S et al (2016) The H<sub>2</sub>S donor NaHS changes the expression pattern of H<sub>2</sub>S-producing enzymes after myocardial infarction. *Oxid Med Cell Longev* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6492469>
- Liang YF, Zhang DD, Yu XJ et al (2017) Hydrogen sulfide in paraventricular nucleus attenuates blood pressure by regulating oxidative stress and inflammatory cytokines in high salt-induced hypertension. *Toxicol Lett* 270:62–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.004>
- Liu H, Wang Y, Xiao Y et al (2016) Hydrogen sulfide attenuates tissue plasminogen activator-induced cerebral hemorrhage following experimental stroke. *Transl Stroke Res* 7:209–219. <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0459-5>
- Lozano D, Gonzales-Portillo GS, Acosta S et al (2015) Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: Etiology, Clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr Dis Treat* 11:97–106. <https://doi.org/10.2147/NDT.S65815>
- McIntosh TK, Vink R, Noble L et al (1989) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience* 28:233–244. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90247-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90247-9)
- Mohammed RA, Mansour SM (2021) Sodium hydrogen sulfide upregulates cystathionine  $\beta$ -synthase and protects striatum against 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *J Pharm Pharmacol* 73:310–321. <https://doi.org/10.1093/JPP/RGAA072>

- Moustafa A (2021) Changes in nitric oxide, carbon monoxide, hydrogen sulfide and male reproductive hormones in response to chronic restraint stress in rats. *Free Radic Biol Med* 162:353–366. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.315>
- Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N et al (2009) H<sub>2</sub>S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci Signal* 2:ra72–ra72. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>
- National Research Council of the National Academies (2011) Guide for the care and use of laboratory animals, 8th edn. The National Academies Press, Washington, DC
- Ning J, Mo L, Zhao H et al (2013) Sodium hydrosulphide alleviates remote lung injury following limb traumatic injury in rats. *PLoS One* 8:59100. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0059100>
- Nogueira JE, Soriano RN, Fernandez RAR et al (2017) Effect of physical exercise on the febrigenic signaling is modulated by preoptic hydrogen sulfide production. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170468>
- Olson KR, DeLeon ER, Gao Y et al (2013) Thiosulfate: A readily accessible source of hydrogen sulfide in oxygen sensing. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 305:592–603. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00421.2012>
- Renga B, Cipriani S, Carino A et al (2015) Reversal of endothelial dysfunction by gpbar1 agonism in portal hypertension involves a AKT/FOXO1 dependent regulation of H<sub>2</sub>S generation and endothelin-1. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141082>
- Roa-Coria JE, Pineda-Farías JB, Barragán-Iglesias P et al (2019) Possible involvement of peripheral TRP channels in the hydrogen sulfide-induced hyperalgesia in diabetic rats. *BMC Neurosci* 20:1–17. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0483-3>
- Santiago-Castañeda C, Segovia-Oropeza M, Concha L et al (2020) Propylparaben Reduces the Long-Term Consequences in Hippocampus Induced by Traumatic Brain Injury in Rats: Its Implications as Therapeutic Strategy to Prevent Neurodegenerative Diseases. *J Alzheimer's Dis* 1–12. <https://doi.org/10.3233/jad-200914>
- Searcy D, Lee S (1998) Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool* 282:310–322. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-010x\(19981015\)282:3%3c310::aid-jez4%3e3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-010x(19981015)282:3%3c310::aid-jez4%3e3.0.co;2-p)
- Segovia-Oropeza M, Santiago-Castañeda C, Orozco-Suárez SA et al (2020) Sodium cromoglycate decreases sensorimotor impairment and hippocampal alterations induced by severe traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 37:2595–2603. <https://doi.org/10.1089/neu.2019.6975>
- Shan H, Qiu J, Chang P et al (2019) Exogenous Hydrogen sulfide offers neuroprotection on intracerebral hemorrhage injury through modulating endogenous H<sub>2</sub>S metabolism in mice. *Front Cell Neurosci* 13:1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00349>
- D'Emmanuele di Villa Bianca R, Mitidieri E, Fusco F et al (2016) Urothelium muscarinic activation phosphorylates CBS Ser227 via cGMP/PKG pathway causing human bladder relaxation through H<sub>2</sub>S production. *Sci Rep* 6. <https://doi.org/10.1038/srep31491>
- Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16:1792–1798. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0211hyp>
- Wang R (2012) Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 92:791–896. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2011>
- Xiao L, Dong J-H, Jin S et al (2016) Hydrogen sulfide improves endothelial dysfunction via downregulating BMP4/COX-2 pathway in rats with hypertension. *Oxid Med Cell Longev* 2016:8128957. <https://doi.org/10.1155/2016/8128957>
- Xu K, Wu F, Xu K et al (2018) NaHS restores mitochondrial function and inhibits autophagy by activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to improve functional recovery after traumatic brain injury. *Chem Biol Interact* 286:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.028>
- Yang G, Pei Y, Teng H et al (2011) Specificity protein-1 as a critical regulator of human cystathionine  $\gamma$ -lyase in smooth muscle cells. *J Biol Chem* 286:26450–26460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266643>
- Yang J, Minkler P, Grove D et al (2019) Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B<sub>6</sub>. *Commun Biol* 2. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0431-5>
- Yu H, Xu H, Liu X et al (2015) Superoxide mediates depressive effects induced by hydrogen sulfide in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Oxid Med Cell Longev* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/927686>
- Zhang M, Shan H, Wang T et al (2013) Dynamic change of hydrogen sulfide after traumatic brain injury and its effect in mice. *Neurochem Res* 38:714–725. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-0969-4>
- Zhang M, Shan H, Chang P et al (2016) Upregulation of 3-MST relates to neuronal autophagy after traumatic brain injury in mice. *Cell Mol Neurobiol* 37:291–302. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0369-9>
- Zhang J, Shi C, Wang H et al (2019) Hydrogen sulfide protects against cell damage through modulation of PI3K/Akt/Nrf2 signaling. *Int J Biochem Cell Biol* 117:105636. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105636>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.