



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD SEDE SUR
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Efecto del sulfuro de hidrógeno en la disfunción
vascular inducida por el traumatismo craneoencefálico
severo en ratas”**

TESIS

que presenta:

Q.F.I. Félix Iván López Preza

Para obtener el grado de

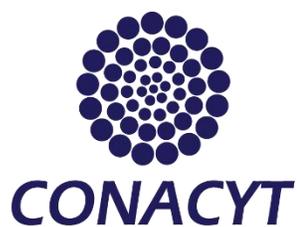
MAESTRO EN CIENCIAS

EN NEUROFARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA EXPERIMENTAL

Directores de la Tesis:
Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta
Dr. David Centurión Pacheco

Ciudad de México

AGOSTO, 2022



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Cinvestav

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta en el laboratorio 8 y del Dr. David Centurión Pacheco en el laboratorio 6, ambos pertenecientes al 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 maestría No. 776264

Dedicatorias

El presente trabajo de investigación está dedicado a mis madres: Manuela Preza Ávila y Enriqueta Ávila Melgarejo, ambas pilares de mi formación no solo académica sino de mi formación como persona. Es por ustedes que soy lo que soy. Gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía y de no temer a las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

Para mis primos Cruz Arturo y Carlos Anselmo, porque espero que todo lo estoy logrando sea un gran ejemplo para ustedes, es normal que en algún momento de nuestras vidas queremos abandonar todo, pero siempre hay alguien a nuestro lado que nos dará la motivación suficiente para continuar. ¡Los quiero mucho! Estoy muy orgulloso de ustedes.

A toda mi familia: mis tías, primos, padrinos en general, porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A mis amigos de Tlapacoyan y de la CDMX, porque con sus ánimos y sus palabras de apoyo me ayudaron a levantarme de cada caída y estuvieron ahí cuando más lo necesitaba.

A Diego Armando y Pedro Michelle, que me sonríen desde el cielo, lo sé...

Agradecimientos

A la **Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta** y al **Dr. David Centurión Pacheco**, quienes con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitieron el desarrollo de este trabajo. Les agradezco infinitamente por abrirme las puertas de sus respectivos laboratorios y sentirme integrado a su equipo de trabajo a pesar de las circunstancias de la pandemia.

Al **Dr. Eduardo Ramírez San Juan**, quien con sus puntuales comentarios hizo posible que este proyecto se extendiera más allá de lo que se planteó al principio. Muchas gracias por su disponibilidad para los avances. Es un gusto contar con sus consejos, sus observaciones y su conocimiento.

A la **Dra. Claudia González Espinosa**, quien siempre estuvo en la mejor disposición para los avances del proyecto, contribuyendo siempre con atinados comentarios y propuestas. Muchas gracias por sus asesorías en la escritura de la tesis, sin duda enriquecieron en gran medida a la misma.

Al personal que labora en el **Bioterio** del CINVESTAV-sede sur porque, a pesar de las circunstancias de la pandemia, siguieron dando el apoyo necesario para el cuidado y entrega de los animales a tiempo.

Al **Lic. Víctor Manuel Mendoza Salas**, por proporcionar recursos y apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

Al **M. en C. Saúl Huerta**; quien confió en mí desde el primer día que ingresé al laboratorio 6, quien me orientó, me apoyó, me enseñó técnicas, me demostró que todo se puede cumplir con dedicación y enfoque. Me regañaste varias veces, pero sé que me lo merecía, y gracias a eso retomaba el camino para seguir adelante, no dejaste que me rindiera y te agradezco de todo corazón lo que has hecho por mí, ¡eres increíble!

A la **M. en C. Cindy Santiago**; quien fue mi maestra en el modelo de TCE, quien me enseñó todo lo necesario y me tuvo toda la paciencia del mundo. Se que a veces me desesperaba, pero agradezco mucho que nunca me dejaras y estuvieses a mi lado en

Agradecimientos

todo momento. Una gran maestra, una gran amiga. ¡Te quiero mucho! Siempre contarás conmigo para lo que necesites.

A la **M. en C. Grecia Medina**, Al **M. en C. Erick Josué** y al **M. en C. Christopher Martínez**; quienes me brindaron asesorías y me ayudaron a resolver dudas que tenía durante la realización del proyecto. Muchas gracias por siempre recibirme con una sonrisa y con la mejor actitud. Asimismo, por los buenos ratos y las pláticas. Los quiero mucho.

A la **Dra. Araceli Sánchez López**, quien conseguía todos los reactivos y materiales necesarios para realizar los experimentos. Muchas gracias por brindarme su tiempo y sus consejos tan sabios.

A la **Q.F.I. Francia Carmona**, que a pesar del poco tiempo en conocernos me ayudó a finalizar detalles del proyecto. Muchas gracias por todo.

A la **M. en C. Diana Laura**, al **M. en C. Hernan Beltran** y al **Dr. Jorge Tapia**, quienes con sus conocimientos y técnicas me pudieron brindar lo necesario para realizar los experimentos. Igualmente, muchas gracias por su amistad y por los buenos ratos en el laboratorio.

A los integrantes del laboratorio 8: al **M. en C. Daniel Fonseca**, a la **M. en C. Monserrat Fuentes** y al **Biomédico Joaquín**, quienes me brindaron su amistad. Son grandes personas y espero seguir aprendiendo de ustedes. Les deseo lo mejor. Asimismo, al **Dr. Daniel Pérez**, que, a pesar del poco tiempo en conocernos, fue pilar en comentarios hacia el proyecto que ayudaron a fundamentarlo mejor. Muchas gracias.

A mis compañeros de la generación, en especial al **Q.F.B. Juan Linares**, al **Médico Alejandro**, al **Médico Arturo Serrano**, a la **Q.F.B. Gabriela** y a la **QFB. Paloma** por brindarme su amistad tanto virtual como presencialmente. Es un gusto conocer personas como ustedes y les deseo mucho éxito en todos sus proyectos.

Abreviaturas

Akt	Proteína cinasa B
AMPK	Proteína cinasa activada por monofosfato de adenina
atm	Atmosferas
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Cisteína aminotransferasa
CE	Concentración efectiva
COX	Ciclooxigenasa
D	Debye
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCF-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
EEM	Error estándar de la media
E _{max}	Efecto máximo
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
FAD	Flavín adenín dinucleótido
GTP	Guanosín trifosfato
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
ICC	Impacto cortical controlado
im	Intramuscular
ip	Intraperitoneal
KO	Gen suprimido
LLPF	Lesión lateral por percusión de fluido
LPF	Lesión por percusión de fluido
LPM	Latidos por minuto
miRNA	Micro RNA
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLV	Músculo liso vascular
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaHS	Sulfhidrato de sodio
p	Probabilidad
PBS	Amortiguador de fosfatos
pCE	Potencial negativo de la concentración efectiva
p-eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial fosforilada
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
PLP	Fosfolipasa
postTCE	Después del TCE
ppm	Partes por millón
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
REDOX	Reducción-oxidación
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies de oxígeno reactivas
rpm	Revoluciones por minuto
Ser	Serina
Sham	Operación simulada

Abreviaturas

SNP	Nitroprusiato de sodio
TBS	Cloruro de terc-butildimetilsililo
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TLR4	Receptor 4 tipo Toll
Tre	Treonina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TRPC6	Canal receptor de potencial transitorio C subtipo 6
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

Índice general

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	ii
Resumen.....	iv
Abstract.....	vi
1. Introducción.....	1
1.1. Traumatismo craneoencefálico.....	1
1.1.1. Definición.....	1
1.1.2. Epidemiología.....	1
1.1.3. Fisiopatología.....	2
1.1.4. Consecuencias sistémicas postTCE.....	4
1.2. Vasos sanguíneos.....	6
1.2.1. Composición de los vasos sanguíneos.....	7
1.2.2. Mecanismos para regular el tono vascular.....	8
1.2.3. Disfunción vascular postTCE.....	13
1.3. Sulfuro de hidrógeno.....	17
1.3.1. Propiedades fisicoquímicas.....	17
1.3.2. Biosíntesis y metabolismo.....	18
1.3.3. Persulfuración de proteínas.....	20
1.3.4. Efectos en el sistema cardiovascular.....	23
1.3.5. Alteraciones en la producción de H ₂ S postTCE.....	24
1.3.6. Efecto de donadores de H ₂ S postTCE.....	25
2. Justificación.....	27
3. Hipótesis.....	27
4. Objetivos.....	27
4.1. Objetivo general.....	27
4.2. Objetivos específicos.....	27
5. Materiales y métodos.....	29
5.1. Sujetos de experimentación.....	29

Índice general

5.2. Modelo de TCE: lesión lateral por percusión de fluidos	29
5.3. Diseño experimental.....	30
5.4. Neuropuntuación	31
5.4. Determinación de la presión arterial y frecuencia cardiaca	32
5.5. Evaluación de la función vascular mediante el modelo de órgano aislado	32
5.6. Efecto per se del H ₂ S y curvas de relajación inducidas por nitroprusiato de sodio	34
5.7. Determinación del estrés oxidante mediante la cuantificación de las ROS	34
5.8. Expresión proteínica de las enzimas CBS, CSE, 3-MST, eNOS y p-eNOS en aorta torácica: Western Blot.....	35
5.9. Análisis estadístico.....	36
6. Resultados.....	38
6.1. Severidad del TCE	38
6.2. Efecto del TCE severo sobre la frecuencia cardiaca y la presión arterial	38
6.3. Efecto del NaHS sobre el peso corporal de los animales inducidos a un TCE severo	39
6.4. Efecto del NaHS sobre la función sensoriomotora de los animales inducidos a un TCE severo.....	40
6.5. Efecto del NaHS sobre la vasorrelajación dependiente de carbacol y de la vasoconstricción dependiente de noradrenalina de los animales inducidos a un TCE severo.....	41
6.6. Efecto per se del NaHS en la vasorrelajación dependiente de endotelio en aortas torácicas de animales inducidos a un TCE severo	44
6.7. Efecto del nitroprusiato de sodio en la vasorrelajación dependiente de endotelio en aortas torácicas de animales inducidos a un TCE severo	46
6.8. Efecto del NaHS en los niveles de ROS en aortas torácicas de animales inducidos a un TCE severo.....	48

Índice general

6.9. Efecto del NaHS en la expresión de las enzimas que sintetizan H ₂ S y de la eNOS y p-eNOS en aortas torácicas de animales sometidos a un TCE severo.	49
7. Discusión	51
7.1. Disfunción sensoriomotora y cambio en el peso corporal inducidos por un TCE severo	51
7.2. El TCE severo induce cambios en la frecuencia cardiaca y la presión arterial... ..	53
7.3. El TCE severo induce cambios en los mecanismos locales de control de la función vascular	54
7.4. La expresión de las enzimas productoras de H ₂ S en la aorta torácica disminuye después de un TCE severo	57
7.5. La administración subcrónica de NaHS no tiene efecto en la disfunción sensoriomotora ni en la ganancia de peso corporal.....	58
7.6. La administración subcrónica de NaHS evita los cambios en la frecuencia cardiaca y la presión arterial ocasionados por el TCE	60
7.7. La administración subcrónica de NaHS evita los cambios en los mecanismos locales del control de la función vascular	60
7.8. La administración de NaHS evita la disminución de la expresión de las enzimas productoras de H ₂ S inducida por el TCE	62
8. Conclusión	64
9. Perspectivas	65
10. Referencias.....	67
11. Anexos	87
11.1. Congresos	87
11.2. Cursos.....	88
11.3. Actividades académicas	88

Índice de figuras

Figura 1. Esquema general de las lesiones secundarias postTCE.....	4
Figura 2. Distribución de las diferentes capas en los vasos sanguíneos y sus componentes.....	8
Figura 3. Síntesis de NO y sus efectos en la célula de músculo liso vascular	9
Figura 4. Fosforilación de la eNOS.....	11
Figura 5. Mecanismos de vasoconstricción en el músculo liso vascular	13
Figura 6. Desacople de la eNOS causado por el estrés oxidante	16
Figura 7. Biosíntesis y metabolismo del H ₂ S.....	19
Figura 8. Reacciones de persulfuración por el H ₂ S.....	21
Figura 9. Persulfuración en proteínas relacionadas con el sistema cardiovascular.....	22
Figura 10. Mecanismos de vasorrelajación por el H ₂ S.	24
Figura 11. Diseño experimental.	30
Figura 12. Pruebas correspondientes a la evaluación de la función sensoriomotora..	31
Figura 13. Ejemplo de un registro obtenido de un anillo de aorta (no escala).....	33
Figura 14. Efecto de la administración de NaHS sobre el peso corporal en animales sometidos a un TCE severo.....	40
Figura 15. Efecto de la administración de NaHS sobre la disfunción sensoriomotora en animales sometidos a un TCE severo.....	41
Figura 16. Efecto de la administración de NaHS en las respuestas vasorrelajantes inducidas por carbacol en aortas torácicas postTCE.....	42
Figura 17. Efecto de la administración de NaHS en las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina en aortas torácicas postTCE.....	44
Figura 18. Efecto del TCE en las respuestas vasorrelajantes inducidas por NaHS en aortas torácicas	45
Figura 19. Efecto de la administración de NaHS en las respuestas vasorrelajantes inducidas por nitroprusiato de sodio en aortas torácicas postTCE.	47
Figura 20. Efecto de la administración de NaHS en los niveles de ROS en aortas torácicas postTCE	48

Índice de figuras

Figura 21. Expresión de las enzimas que sintetizan H ₂ S en aortas torácicas postTCE	49
Figura 22. Efecto de la administración de NaHS en la expresión de la eNOS y p-eNOS en aortas torácicas postTCE	50
Figura 23. Mecanismos que conllevan a la disfunción sensoriomotora y pérdida de peso corporal postTCE.	53
Figura 24. El efecto del H ₂ S exógeno en la disfunción sensoriomotora y la pérdida de peso corporal depende del tipo de donador y del tiempo de administración y de evaluación postTCE.	59
Figura 25. Resumen de los efectos de la administración exógena de H ₂ S en las alteraciones vasculares postTCE.....	63

Índice de tablas

Tabla 1. Vasos sanguíneos: tipo, diámetro y función en el sistema cardiovascular de los vertebrados y algunos invertebrados.	7
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del H ₂ S	17
Tabla 3. Pruebas estadísticas utilizadas para cada experimento.	36
Tabla 4. Efecto de la administración subcrónica de NaHS en los valores de frecuencia cardíaca y presión arterial en animales inducidos a un TCE severo.	38
Tabla 5. Efecto máximo y potencia del carbacol y noradrenalina en aortas torácicas provenientes de los diferentes grupos experimentales.	44
Tabla 6. Efecto máximo y potencia del NaHS en aortas torácicas provenientes de los diferentes grupos experimentales.	46
Tabla 7. Efecto máximo y potencia del nitroprusiato de sodio en aortas torácicas provenientes de los diferentes grupos experimentales	47

Resumen

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es una condición que afecta al sistema nervioso central y conduce a deficiencias sistémicas. Particularmente en el sistema cardiovascular, la presión sanguínea es alterada después de un TCE severo. Debido a lo anterior, la hipertensión es una de las comorbilidades más frecuentes en los sobrevivientes de un TCE severo. Debido a que se sabe que la hipertensión está relacionada con el decremento en la síntesis de sulfuro de hidrógeno (H_2S), el presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de la administración subcrónica vía intraperitoneal (ip) de NaHS, un donador exógeno de H_2S , en las alteraciones vasculares inducidas por el TCE severo. Ratas Wistar macho fueron sometidas a un modelo de lesión lateral por percusión de fluido y las aortas torácicas fueron obtenidas 7 días después de la inducción del TCE severo. La función vascular fue evaluada determinando la frecuencia cardíaca y la presión arterial por el método pletismográfico y utilizando el modelo de órgano aislado. Por otro lado, los niveles de ROS se determinaron por el método de DCF-DA mientras que la expresión de las enzimas productoras de H_2S y la eNOS se determinó por la técnica de Western Blot. La función sensoriomotora fue evaluada usando la prueba del neuropuntaje. Después de 7 días de la inducción del TCE severo, los animales mostraron 1) un decremento en el peso corporal; 2) una disfunción sensoriomotora; 3) aumento en las variables de frecuencia cardíaca y presión arterial; 4) un aumento en los niveles de estrés oxidante, 5) una disfunción vascular caracterizada por un decremento en la vasorrelajación inducida por carbacol y un aumento en la contracción inducida por noradrenalina; y 6) una disminución en la expresión de las enzimas productoras de H_2S y la eNOS. De manera interesante, la administración subcrónica de NaHS (3.1 mg/kg; ip; cada 24 horas por siete días, iniciando 24 horas después de la inducción del TCE severo) evitó la alteración en 1) la frecuencia cardíaca y la presión arterial; 2) la expresión de las enzimas productoras de H_2S , así como la eNOS y su fosforilación; 3) los niveles de estrés oxidante; y 4) la función vascular inducida por TCE severo, restaurando la vasorrelajación dependiente de carbacol y la vasoconstricción inducida por noradrenalina sin tener efecto en el peso corporal o en las alteraciones sensoriomotoras. Estos resultados sugieren que el H_2S podría ser empleado como una estrategia terapéutica novedosa para prevenir la hipertensión postTCE severo.

Abstract

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) is a condition that affects the central nervous system and leads to systemic impairments. Particularly, in the cardiovascular system, the systemic blood pressure is altered after a severe TBI. Indeed, systemic hypertension is one of the most frequent comorbidities in TBI survivors. Moreover, hypertension is related to a decrease in hydrogen sulfide (H₂S) synthesis. Therefore, this study aimed to assess the effects of i.p. subchronic administration with NaHS, an exogenous H₂S donor, on the TBI-induced vascular impairments. Animals underwent a lateral fluid percussion injury, and thoracic aortas were obtained seven days after severe TBI induction. The vascular function was measured with hemodynamic variables and heart rate and using isolated tissue bath assays, the levels of reactive oxygen species were measured with the DCF-DA technique and the expression of H₂S enzymes and eNOS was determined by Western Blot technique. The sensorimotor function was evaluated using the *neuroscore* test. After seven days of the severe TBI induction, animals showed: 1) a decrease in body weight, 2) sensorimotor dysfunction, 3) an increase in hemodynamic variables and heart rate, 4) an increase in oxidative stress levels, 5) a vascular dysfunction characterized by a decrease in the vasorelaxation induced by carbachol and an increase in contraction induced by norepinephrine, and 6) a decrease in the expression of H₂S-producing enzymes and eNOS. Interestingly, NaHS subchronic administration (3.1 mg/kg; i.p.; every 24 h for seven days, starting 24 h after severe TBI induction) avoided alterations in: 1) hemodynamic variables and heart rate, 2) expression of H₂S-producing enzymes as well as eNOS and its phosphorylation, 3) oxidative stress levels, 4) severe TBI-induced vascular dysfunction by restoring carbachol-dependent vasorelaxation and norepinephrine-induced vasoconstriction without any effect on the body weight or sensorimotor impairments. Taken together, these results, suggest H₂S that could be used as a novel therapeutic strategy to prevent post-severe TBI hypertension.

Introducción

1. Introducción

1.1. Traumatismo craneoencefálico

1.1.1. Definición

El traumatismo craneoencefálico, de acuerdo con el CDC (Center for Disease Control and Prevention, USA) se define como una interrupción en la función del cerebro cuyo origen puede ser un golpe directo, una sacudida repentina o una lesión penetrante en la cabeza (CDC, 2017a). El TCE resulta en diversas alteraciones que pueden llevar a una discapacidad temporal o permanente en la función cognitiva o motora (American Association Neurological Surgeons, 2020). En la clínica, la escala de coma de Glasgow se utiliza para clasificar al TCE en leve (14-15 puntos), moderado (9-13 puntos) o severo (3-8 puntos) (Mena et al., 2011).

1.1.2. Epidemiología

En los últimos años, el TCE se ha convertido en un problema de salud pública a nivel global. Se estima que cada año entre 64 y 74 millones de personas sufren de un TCE a nivel global (Haarbauer-Krupa et al., 2021). En el 2018 se publicó que la incidencia anual del TCE era de 939 casos por cada 100,000 habitantes. De esos casos, 740 casos correspondían a un TCE leve y 73 casos correspondían a un TCE moderado/severo (Dewan et al., 2018).

En México, el TCE es la cuarta causa de muerte con una mortalidad de 38.8 por cada 100,000 habitantes, afectando principalmente a personas de entre 15 a 45 años (Carrillo-Esper & Meza-Márquez, 2015). La población en riesgo de sufrir un TCE son las personas que practican deportes de contacto como es: fútbol americano, rugby, fútbol soccer, boxeo, lucha libre, baloncesto y hockey. Sin embargo, los accidentes de tráfico es la causa más común, con un 75% de los casos, aunado a los accidentes de motociclistas y personas que manejan en estado de ebriedad (Carrillo-Esper & Meza-Márquez, 2015; Ortiz, 2016). Un gran porcentaje de sobrevivientes a un TCE moderado o severo tienen secuelas incapacitantes de por vida, las cuales afectan también a nivel económico, ya que el CDC estimó aproximadamente un gasto de \$76.5 mil millones de dólares en el 2010 (CDC, 2017b).

1.1.3. Fisiopatología

El TCE genera una serie de eventos que culminan con el daño cerebral y, a largo plazo, con complicaciones a nivel sistémico. Para abordar la fisiopatología del TCE las lesiones se dividen en lesiones primarias y lesiones secundarias.

1.1.3.1. Lesiones primarias

Las lesiones primarias representan el daño focal, presentándose inmediatamente (aproximadamente 100 milisegundos después del impacto) como resultado del daño mecánico directo. Las lesiones primarias incluyen a los hematomas intracraneales, fracturas de cráneo, laceraciones, contusiones y heridas penetrantes (Sande & West, 2010; Kaur & Sharma, 2018).

Un tipo importante de lesión primaria es la lesión axonal difusa. Este tipo de lesión excede los límites del sitio del impacto y se expande en todo el cerebro. Se presenta cuando el origen del TCE proviene de un movimiento de aceleración/desaceleración ya que en este tipo de movimientos se inducen tensiones dinámicas de cizallamiento, tracción y compresión que dañan las redes axonales profundas del cerebro (Mustafa & Alshboul, 2013). Desafortunadamente, las lesiones primarias no se pueden prevenir; sin embargo, pueden tratarse para evitar que evolucionen a las lesiones secundarias.

1.1.3.2. Lesiones secundarias

Las lesiones secundarias son los eventos bioquímicos, celulares y fisiológicos que ocurren durante la lesión primaria que pueden progresar a daños sistémicos con una duración de horas a años (Ng & Lee, 2019). Las principales lesiones secundarias en pacientes con TCE son la isquemia, hipoxia, edema cerebral, elevación de la presión intracraneal, acidosis, liberación de neurotransmisores excitadores (glutamato y aspartato) y formación de radicales libres. Todos los eventos secundarios culminan en (figura 1) (Ng & Lee, 2019; Faridar et al., 2011):

- **Excitotoxicidad:** se presenta un desbalance entre las sinapsis inhibitorias (GABA) y un aumento en las sinapsis excitadoras (glutamato) lo que induce el aumento de la

Introducción

producción de ATP, además del aumento de calcio intracelular conllevando a la hiperexcitabilidad y muerte neuronal.

- Estrés oxidante, caracterizado por el aumento de las ROS provocado por las múltiples hemorragias, aumentando compuestos como el 4-hidroxi-2-nonenal por la peroxidación de lípidos que generan agregados de α -sinucleína que favorece la formación de ROS.
- Neuroinflamación, mediada por un aumento en la liberación de mediadores inflamatorios, como son citocinas en el parénquima cerebral, por el sistema inmune y la sobreactivación de la microglía. Una de las proteínas involucradas es la S100A-9 que conduce a vías de apoptosis y la formación de ROS. Otras proteínas relacionadas a enfermedades neurológicas son segregadas como es la proteína β -amiloidea (relacionada con Parkinson).
- Disrupción de la barrera hematoencefálica, caracterizada por la disminución de proteínas relacionadas con las uniones herméticas (occludina, claudina-5) y adherentes (ZO-1), resultando en un aumento de la permeabilidad.

Recientemente, se encontró que el TCE induce pérdida de peso acompañada de un daño neuromotor, aumentando la excitabilidad hipocampal y una mayor muerte neuronal hipocampal (Santiago-Castañeda et al., 2020; Segovia-Oropeza et al., 2020).

En conjunto, las lesiones primarias y secundarias provocan un desbalance de los mecanismos centrales induciendo un estado de inflamación a nivel sistémico. Dicho estado inflamatorio contribuye a la disfunción de órganos extra cerebrales, por lo que el TCE es un problema a nivel central y a nivel periférico (Kinoshita, 2016).

Introducción

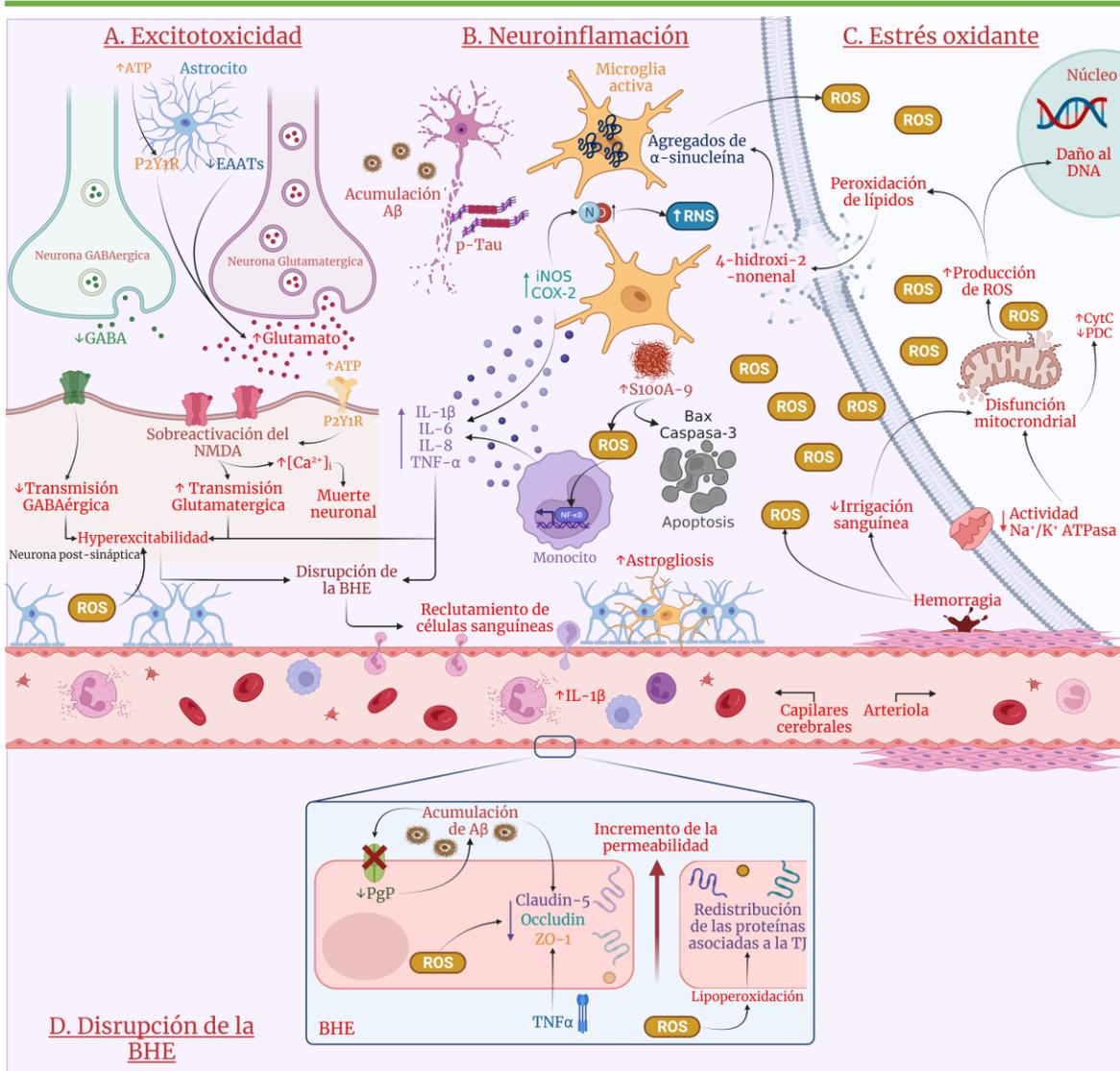


Figura 1. Esquema general de las lesiones secundarias postTCE. P2Y1R, receptor P2Y1; EAATs transportador de aminoácidos excitadores; $A\beta$, proteína β -amiloidea; ROS, Especies de oxígeno reactivas; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; COX-2, ciclooxigenasa-2; CytC citocromo C; PDC, complejo piruvato deshidrogenasa; PgP, glicoproteína P. TJ: proteínas de las uniones estrechas; ZO-1: Zonula 1. (Ng & Lee, 2019; Faridar et al., 2011)

1.1.4. Consecuencias sistémicas postTCE

Se ha reportado que el 89% de los pacientes que padecen un TCE severo pueden presentar una disfunción orgánica significativa (Wijayatilake et al., 2015). Dichas complicaciones pueden originarse del efecto directo del traumatismo (liberación excesiva de catecolaminas y neuroinflamación) o como resultado de los efectos secundarios de la terapia (tratamiento en terapia intensiva dirigida a problemas neurológicos y pueden generar complicaciones no

Introducción

neurológicas) (Corral et al., 2012). De acuerdo con Zygun y colaboradores, los principales sistemas que sufren una disfunción orgánica postTCE son el respiratorio (81%), cardiovascular (52%), renal (8%) y hepático (7%) pero también se ve involucrado el sistema endocrino y el sistema inmunológico (Zygun et al., 2005; Sabet et al., 2021).

Las interacciones neurológicas-cardíacas se afectan después de un TCE. En este sentido, el TCE ocasiona disfunciones electrofisiológicas y miocárdicas. Esto es debido al aumento de la presión intracraneal que afecta a zonas desencadenantes como es la arteria cerebral anterior, núcleos del tracto solitario, bulbo raquídeo e hipotálamo (Šedý et al., 2015; Wijayatilake et al., 2015). El estímulo en estas zonas desencadena una liberación excesiva de catecolaminas al torrente sanguíneo, una disfunción autonómica y una respuesta inflamatoria sistémica (Wijayatilake et al., 2015).

1.1.4.1. Consecuencias en el sistema cardiovascular postTCE

Con respecto al sistema cardiovascular, diversos autores reportaron que después de un TCE puede inducir isquemia subendocárdica, disfunción endotelial e hipertensión arterial sistémica (Prathep et al., 2014; Siwicka-Gieroba et al., 2021; Gaddam et al., 2015). A nivel clínico, en pacientes que sufrieron un TCE, se ha observado anomalías en los segmentos ST y en la onda T. Asimismo, un aumento en la dispersión del intervalo QT (diferencia entre el intervalo QT máximo y mínimo) en el electrocardiograma. Estos cambios observados se relacionan con un daño al miocardio postTCE. (Sabet et al., 2021, Fan et al., 2012).

Con relación a los cambios en la presión arterial, se ha reportado que después de 13 horas y hasta 24 horas postTCE, los pacientes presentan una disfunción sistólica, la cual se acompaña de una disminución en la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Krishnamoorthy et al., 2017). Aunado a esto, se observó que después de 3 días postTCE existe disfunción autonómica en los pacientes caracterizada por una pérdida del tono miogénico vascular y/o una disminución del tono vagal (Bishop et al., 2017). Un estudio retrospectivo a 10 años demostró que la hipertensión es la tercera comorbilidad más frecuente en los pacientes sobrevivientes de un TCE (Hammond et al., 2019). Es importante señalar que dichas

Introducción

alteraciones cardiovasculares repercuten en la recuperación de los pacientes (Hilz et al., 2017).

Por otra parte, en ensayos preclínicos con el modelo de lesión por percusión de fluidos (LPF) se encontró un aumento de la enzima cardíaca troponina I a partir de 1 a 4 horas postTCE (Rimaz et al., 2019) y una disminución en la fracción de eyección y en la fracción de acortamiento en el corazón (Sabet et al., 2021). Se ha reportado que después de un TCE se presentan fluctuaciones en la presión arterial durante los primeros 6 días de evaluación (McMahon et al., 2011; Umamoto et al., 2019; Larson et al., 2012; Chen et al., 2019). Asimismo, después de 7 días y hasta 28 días de evaluación postTCE se encontró que los animales presentan hipertensión arterial (Huerta de la Cruz et al., 2022). En su conjunto, estos resultados apoyan la idea de que la hipertensión arterial es una de las complicaciones que se mantienen en los sobrevivientes de un TCE severo. En la siguiente sección se estudia a profundidad la fisiología de los vasos sanguíneos y sus alteraciones que pueden desencadenar la hipertensión arterial.

1.2. Vasos sanguíneos

El sistema cardiovascular tiene como objetivo el poder proporcionar suministro de sangre a todo el cuerpo. Dicho sistema está compuesto principalmente por: 1) el corazón y 2) los vasos sanguíneos. El corazón funciona como una bomba que expulsa la sangre hacia todos los tejidos a través de los vasos sanguíneos (Klabunde, 2012; Chaudhry et al., 2021). Los vasos sanguíneos se clasifican de acuerdo con el calibre y su función (Tabla 1).

Actualmente, se ha reportado que los vasos sanguíneos tienen otras funciones fisiológicas aparte de ser conductos de transporte, por ejemplo, participan activamente en el desarrollo de órganos, la morfogénesis de tejidos, en el proceso de inflamación, en la formación de barreras y en la cicatrización de heridas (Ramasamy et al., 2017). La mayoría de los vasos sanguíneos comparten la misma composición, la cual se detallará en la siguiente subsección.

Introducción

Tabla 1. Vasos sanguíneos: tipo, diámetro y función en el sistema cardiovascular de los vertebrados y algunos invertebrados (Klabunde, 2012).

Tipo de vaso sanguíneo	Diámetro (mm)	Función
Aorta (arteria de gran calibre)	25	Amortiguadora del pulso y distribución
Arterias de mediano calibre	1.0-10.0	Distribución
Arterias de pequeño calibre	0.2-1.0	Distribución y resistencia
Arteriolas	0.01-0.20	Resistencia (presión / regulación del flujo)
Capilares	0.006-0.010	Intercambio*
Vénulas	0.01-0.20	Intercambio*, colección* y capacitancia
Venas	0.2-10.0	Capacitancia (volumen sanguíneo)
Vena Cava	35	Colección*

*: O₂, CO₂, H₂O, electrolitos, proteínas, sustratos y subproductos metabólicos, hormonas circulantes

1.2.1. Composición de los vasos sanguíneos

La mayoría de los vasos sanguíneos están compuestos por 3 capas (excepto los capilares y las pequeñas vénulas postcapilares) (Figura 2): 1) la capa más externa es la túnica adventicia, cuyos componentes son fibroblastos y miofibroblastos además de residir las terminaciones nerviosas del sistema nervioso simpático, 2) la túnica media, la cual está compuesta por células de músculo liso vascular (MLV) y 3) la túnica íntima, la capa más interna, la cual está en contacto con los componentes sanguíneos y que la conforman las células endoteliales (Klabunde, 2012). El endotelio vascular es una monocapa de células endoteliales con un espesor de 80 nm. Estas células tienen una orientación a lo largo de la pared sanguínea con el propósito de minimizar el esfuerzo cortante que la sangre ejerce (Krüger-Genge et al., 2019).

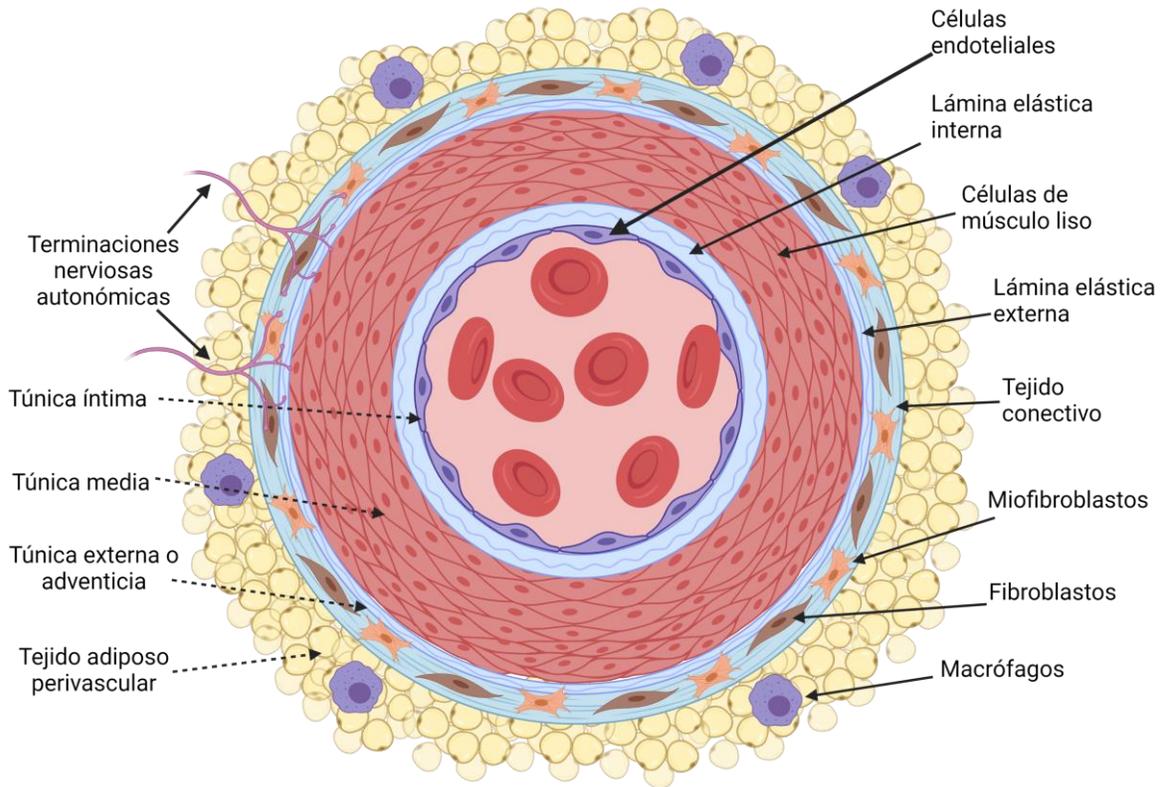


Figura 2. Distribución de las diferentes capas en los vasos sanguíneos y sus componentes. Los vasos sanguíneos están recubiertos en su parte más externa por una capa de tejido adiposo perivascular, en este tejido se encuentran células del sistema inmunológico como son los macrófagos. Posteriormente se encuentra la túnica externa o adventicia donde se tiene miofibroblastos, fibroblastos y terminaciones nerviosas específicamente del sistema nervioso simpático que inerva a la túnica media que la compone células del MLV y por último en la parte más externa la túnica íntima. Entre la túnica íntima y la túnica media se encuentra una lámina elástica al igual que entre la túnica media y la túnica adventicia. (Klabunde, 2012).

1.2.2. Mecanismos para regular el tono vascular

1.2.2.1. Vasorrelajación dependiente de endotelio

El endotelio vascular es un órgano activo paracrino, endocrino y autocrino que es indispensable para la regulación del tono vascular y de mantener la homeostasis vascular (Hadi et al., 2005). El endotelio vascular modula respuestas inflamatorias, coagulación, angiogénesis y diámetro vascular (Krüger-Genge et al., 2019). Existen dos vías involucradas con la vasorrelajación dependiente de endotelio: la vía del óxido nítrico (NO) y la hiperpolarización dependiente de endotelio.

Introducción

El NO, descrito por Furchgott como el factor relajante derivado del endotelio (Furchgott & Vanhoutte, 1989), es una molécula pequeña considerada como el primer gasotransmisor identificado. El término “gasotransmisor” se introdujo en 2002 para describir a moléculas que comparten las siguientes características comunes: 1) ser una molécula gaseosa pequeña, 2) tener la capacidad de atravesar la membranas celulares libremente, 3) se producen de forma endógena por diferentes vías enzimáticas, 4) el uso de donadores exógenos puede mimetizar los efectos de la molécula endógena, 5) poseen funciones específicas en concentraciones fisiológicas relevantes y 6) participan en vías de transducción de señales y tienen blancos específicos (Wang, 2003). La enzima que sintetiza el NO es la óxido nítrico sintasa (NOS), la cual tiene 3 isoformas dependiendo de donde se sintetiza: nNOS (neuronal-sistema nervioso central), eNOS (endotelio vascular) e iNOS (inducible en células del sistema inmune) (Chachlaki & Prevot, 2019). En el endotelio vascular, el NO se produce a través de la oxidación, mediada por la eNOS, del aminoácido L-arginina dando como producto al NO y la L-citrulina (Figura 3).

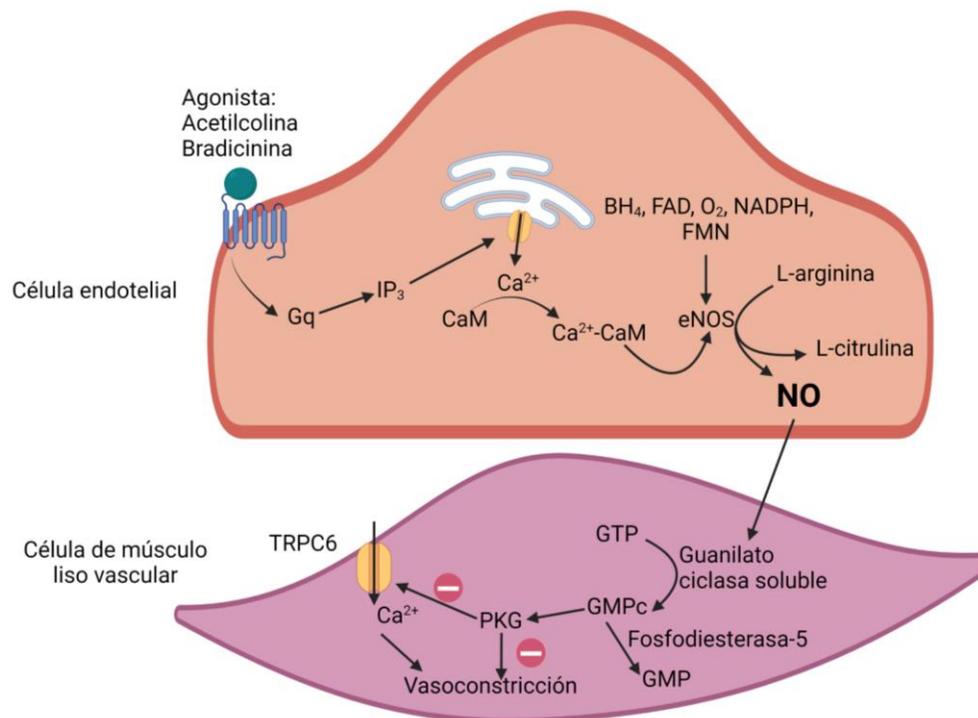


Figura 3. Síntesis de NO y sus efectos en la célula de músculo liso vascular. G_q: proteína G subunidad q, IP₃: inositol-1,4,5-trisfosfato, CaM: calmodulina, BH₄: tetrahydrobiopterina, FAD: flavín adenín dinucleótido, NADPH: nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato, GTP:

Introducción

trifosfato de guanosina, GMP: monofosfato de guanosina (Modificado de Llorens et al., 2002).

Para sintetizar NO, la eNOS requiere oxígeno molecular y un conjunto de cofactores como es el NADPH, FAD, flavina mononucleótido (FMN), tetrahidrobiopterina (BH₄) así como el complejo calcio-calmodulina (Ca²⁺/CaM). Este complejo se origina con la entrada de calcio a las células endoteliales por sustancias químicas como la acetilcolina y la bradicinina, que fungen como agonistas de receptores acoplados, principalmente, a proteínas Gq (Villalba et al., 2017).

Una vez generado, el NO, al ser un gas, difunde a las células del MLV, donde activa a la enzima guanilato ciclasa soluble (GCS), que convierte al GTP a GMP cíclico (GMPc). A su vez, el GMPc activa a la PKG (proteína cinasa G) que tiene como función principal promover la vasorrelajación a través de la fosforilación de varias proteínas en el músculo liso y evitar el aumento de calcio al citosol del MLV (Villalba et al., 2017). Finalmente, existen moléculas en el citosol del MLV que hidrolizan al GMPc a GTP, llamadas fosfodiesterasas (PDE), estas enzimas tienen como función la modulación de la duración e intensidad de la respuesta intracelular del GMPc. Existen 11 familias de las enzimas PDE, la familia PDE-5 es la predominante en el MLV (Chachlaki & Prevot, 2019). Se han reportado diferentes mecanismos por los cuales se aumenta la actividad de la eNOS siendo la fosforilación de la eNOS el mecanismo por excelencia para aumentar dicha actividad (Fleming, 2009).

La eNOS puede ser fosforilada en diferentes residuos: serina, treonina o tirosina (Kolluru et al., 2010). La fosforilación en los residuos Ser⁶¹⁷, Ser⁶³⁵ y Ser¹¹⁷⁷ resultan en la activación de la eNOS. Mientras que, la fosforilación en los residuos Ser¹¹⁶ y Tre⁴⁹⁷ reduce la función de la eNOS (Kolluru et al., 2010). Ejemplo de moléculas que inducen la fosforilación de eNOS es el VEGF (figura 4) la cual, al activar a su receptor, conlleva a la activación de Akt dependiente de PI3-cinasa (PI3K), lo que da como resultado la fosforilación de la eNOS en el residuo Ser¹¹⁷⁷, conduciendo a una mayor actividad de la eNOS y por lo tanto una mayor liberación de NO (Chen et al., 2006; Oubaha & Gratton, 2009)

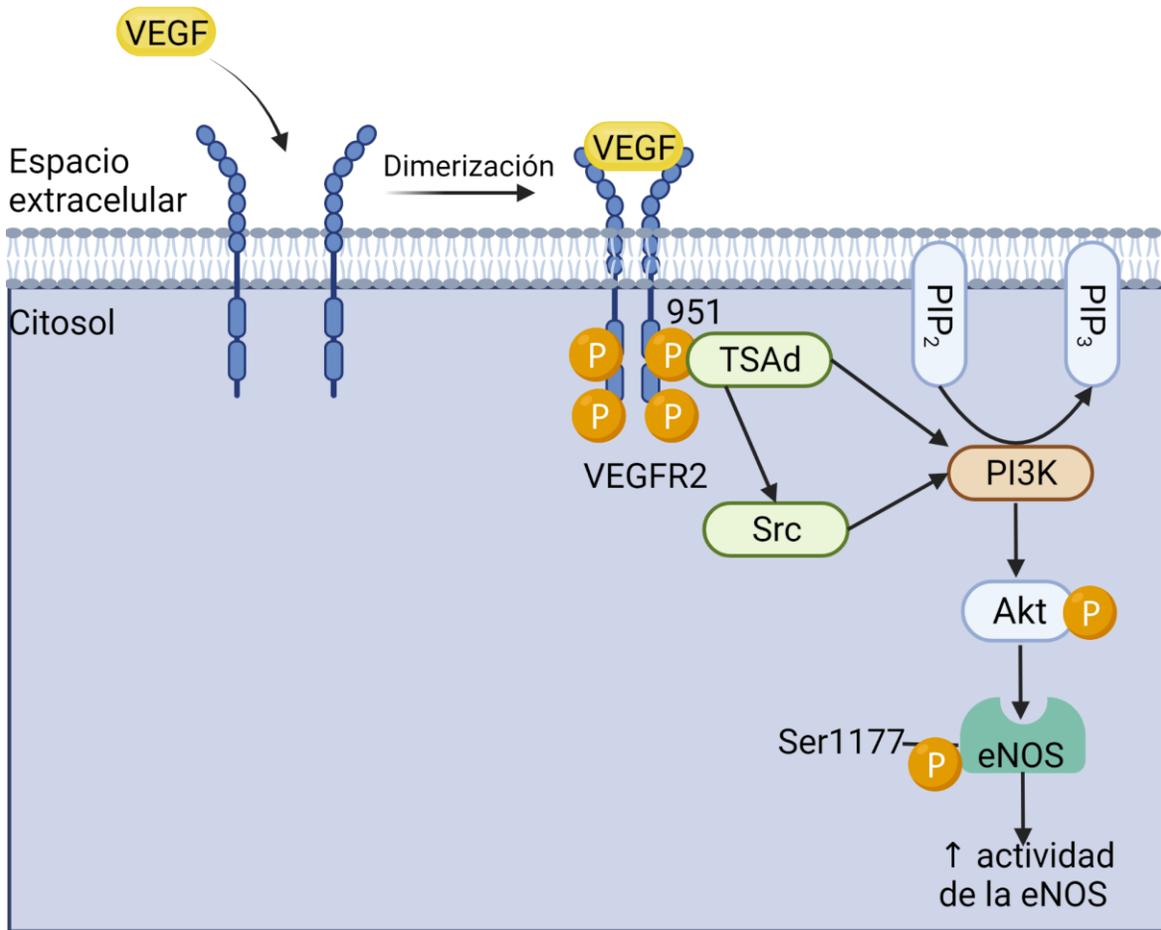


Figura 4. Fosforilación de la eNOS. Una de las moléculas capaces de inducir la fosforilación de la eNOS es la molécula de VEGF, la cual se une a su receptor VEGFR-2 induciendo su dimerización y su autofosforilación. La fosforilación en el residuo Tir⁹⁵¹, induce la activación de la proteína TSAd (Proteína adaptadora específica de células T) y puede activar directamente a la PI3K o por medio de la proteína Src (proto-oncogén tirosina-proteína cinasa) activando la Akt provocando la fosforilación del residuo Ser1177 y así aumentar la actividad de la eNOS; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR2: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2; PIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PIP₃: fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato; Akt: proteína cinasa B; eNOS: sintasa del óxido nítrico endotelial (Mattapally & Banerjee, 2011)

Cuando hay una disminución en la fosforilación de la eNOS se presentan diversas complicaciones como es la disfunción endotelial, que conduce a hipertensión, dislipidemia y otras enfermedades. Por lo que el inducir la fosforilación de la eNOS, principalmente en el residuo de Ser¹¹⁷⁷, funciona como un enfoque para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares en modelos de diabetes, obesidad, hipertensión y síndrome metabólico (Kolluru et al., 2010).

Existe otro mecanismo de vasorrelajación que se lleva a cabo directamente en el músculo liso vascular mediante la activación de receptores β_2 -adrenérgicos (figura 5), los cuales están acoplados a la vía Gs siendo la adrenalina el agonista principal de estos receptores. La vasorrelajación se da por la inhibición de la MLCK a causa del aumento del AMP cíclico (AMPc) (Klabunde, 2012).

1.2.2.2. Vasoconstricción en el músculo liso vascular

La vasoconstricción del vaso sanguíneo se lleva a cabo principalmente por activación del receptor α -adrenérgico en el músculo liso vascular (figura 5) (Brozovich et al., 2016). En el músculo liso vascular se expresan receptores α_1 y α_2 -adrenérgicos, los cuales pueden activarse por la noradrenalina liberada de las terminaciones nerviosas simpáticas. El receptor α_1 -adrenérgico está acoplado a una vía de señalización Gq, lo que induce un aumento de la concentración de calcio citosólico y activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), la cual fosforila a la cadena ligera de la miosina en presencia de ATP. Dichas cadenas son subunidades reguladoras para la formación de puentes cruzados entre las cabezas de miosina y los filamentos de actina lo que concluye en la vasoconstricción (Klabunde, 2012). De manera paralela, la activación de la vía Gq activa la vía de la proteína RhoA, la cual permite la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), esta enzima evita la fosforilación de la cadena ligera de la miosina y por tanto la vasoconstricción (Chen et al., 2022).

Por otro lado, la noradrenalina puede unirse también a los receptores α_2 -adrenérgicos, el cual está acoplado a la vía Gi, esta vía tiene como resultado la inhibición de la formación de AMPc, esta molécula inhibe a la MLCK, por lo que la disminución del AMPc favorece la vasoconstricción (Klabunde, 2012).

En el MLV también se expresan canales de calcio cuya activación induce la entrada del ion al citosol, como son los canales TRPC6 (Smith et al., 2020). Diversos estudios han reportado que después de un TCE severo puede presentarse un desbalance entre los factores vasorrelajantes y contráctiles que conllevan a una disfunción vascular.

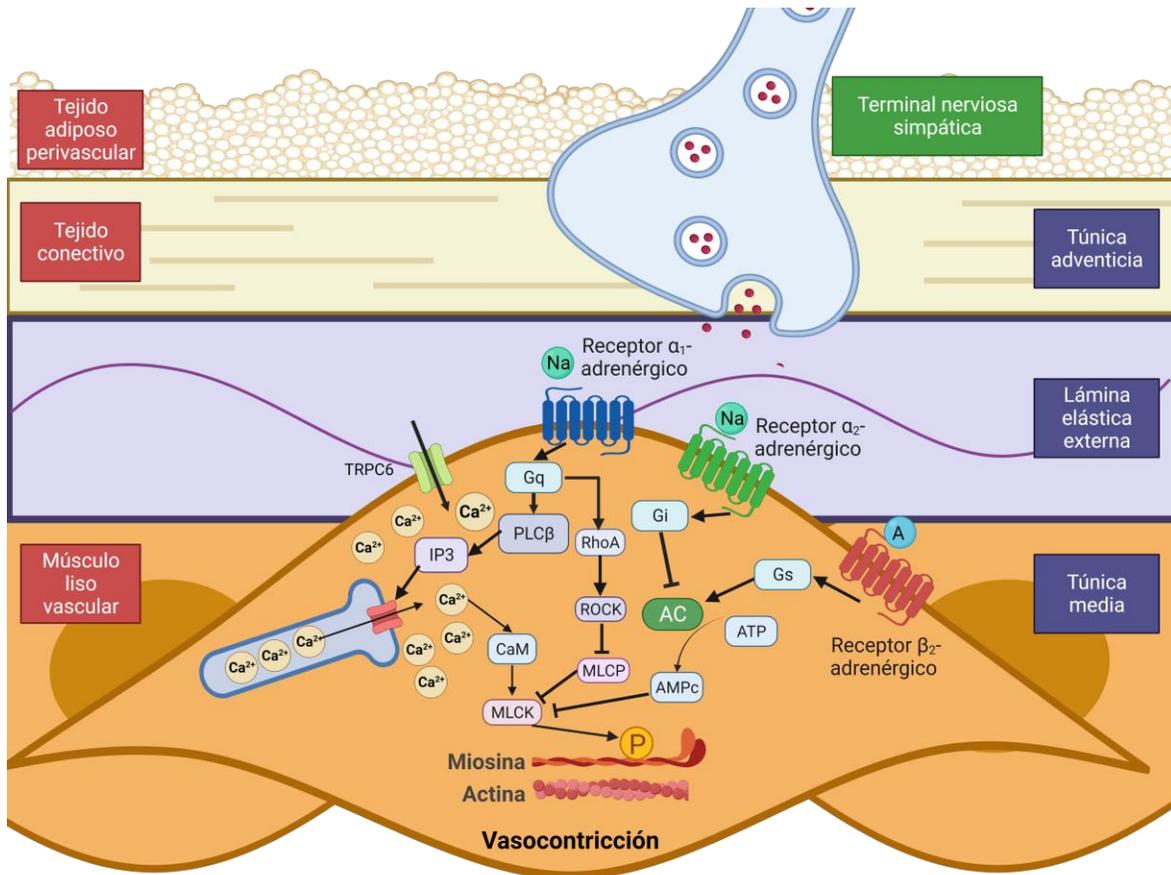


Figura 5. Mecanismos de vasoconstricción en el músculo liso vascular. La vasoconstricción del músculo liso vascular está mediada por diferentes vías de señalización regulada por el aumento de calcio en el citosol de la célula por la activación de receptores α -adrenérgicos. A: adrenalina, Na: Noradrenalina, PLC β : fosfolipasa C beta, TRPC6: Canal de catión, potencial de receptor transitorio subfamilia 6, IP3: fosfatidil inositol trifosfato, CaM: complejo calcio-calmodulina, MLCK: cinasa de la cadena ligera de la miosina, MLCP: fosfatasa de la cadena ligera de la miosina, RhoA: proteína transformadora, ROCK: proteína cinasa asociada a Rho, AC: adenilato ciclasa (Brozovich et al., 2016)

1.2.3. Disfunción vascular postTCE

La disfunción vascular está caracterizada por una reducción de la biodisponibilidad de agentes vasodilatadores, particularmente del NO, y/o un incremento en los factores contráctiles (Van Sloten, 2019). Como resultado, se presentan estados proinflamatorios, proliferativos y procoagulantes que favorecen todas las etapas de la aterogénesis y el aumento de la presión arterial sistémica (Hadi et al., 2005).

Introducción

A la fecha, existen evidencias de que los cambios en la presión arterial inducidos por un TCE severo pueden estar mediados por hiperactividad simpática (Huerta de la Cruz et al., 2022) así como alteraciones en el tono vascular (Chen et al., 2019, Villalba et al., 2017). En este sentido, se reportó que a partir de las 24 h postTCE (leve o moderado) existe una disminución de las respuestas vasorrelajantes dependientes de NO y un aumento de las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina en vasos sanguíneos (aorta, mesentérica), lo que sugiere que el TCE es capaz de inducir disfunción vascular en vasos sanguíneos sistémicos (Chen et al., 2019, Villalba et al., 2017).

Evidencias experimentales indican que dicha disfunción vascular postTCE puede estar mediada por: (1) una alteración de la síntesis de NO en las células endoteliales a causa del aumento del estrés oxidante (Villalba et al., 2017); (2) la activación del canal receptor de potencial transitorio C subtipo 6 en el músculo liso vascular (TRPC6, Figura 5) (Chen et al., 2019); y (3) una sobreactivación de receptores α -adrenérgicos por hiperactividad simpática (Huerta de la Cruz et al., 2022).

1.2.3.1. Estrés oxidante

Las lesiones secundarias derivadas del TCE tienen como consecuencia el aumento del estrés oxidante. Dicho aumento está caracterizado por la formación de radicales libres. Los radicales libres son átomos o grupos de átomos con un número no pareado de electrones que pueden ser formados cuando el oxígeno interactúa con ciertas moléculas. Una vez formados, los radicales libres son muy reactivos y pueden iniciar una reacción en cadena (Cornelius et al., 2013). Entre estos radicales libres se encuentran las ROS, las cuales se describen como un tipo de molécula inestable que contiene oxígeno y que reaccionan fácilmente con otras moléculas en una célula cuya acumulación puede dañar al DNA, RNA y proteínas, y puede causar la muerte celular (Ray et al., 2012).

Después de un TCE ocurre la generación severa de ROS en el parénquima cerebral (Kuriakose et al., 2019), entre los que destacan los aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\bullet OH$). El endotelio vascular, que regula el paso de macromoléculas y células circulantes de la sangre a los tejidos, es objetivo del estrés oxidante

Introducción

y desempeñan un papel fundamental en la fisiopatología de varias enfermedades y trastornos vasculares entre ellos la disfunción endotelial (Cornelius et al., 2013; Hadi et al, 2005).

En modelos animales, usando el modelo de impacto cortical controlado (ICC) se encontraron niveles altos de peróxido de hidrógeno y radicales libres (Lutton et al., 2019). En el caso de la vasculatura sistémica, los niveles del potencial REDOX (indicador de estrés oxidante) se encuentran elevados después del TCE a causa de la formación del radical superóxido. Estos hallazgos tienen como punto final el desacople de la eNOS (Villalba, 2017) (figura 6).

1.2.3.2. Desacoplamiento de la eNOS

El desacoplamiento de la eNOS (figura 6) está descrito como un mecanismo que conduce a la disfunción endotelial por la producción de radicales libres por parte de la eNOS en lugar del NO (Yang-Ming et al., 2009). Este fenómeno está dado principalmente por la oxidación de la tetrahidrobiopterina (BH₄), la cual al oxidarse induce la formación de dihidrobiopterina (BH₂), favoreciendo el aumento del estrés oxidante (Yokoyama & Hirata, 2007; Santhanam et al., 2015).

Por otro lado, en un trastorno hipertensivo en mujeres con preeclampsia, el estrés oxidante que se presenta provoca el aumento de la actividad de la arginasa provocando que esta enzima utilice a la L-arginina en vez de la eNOS disminuyendo la producción de NO y también aumentando la producción del radical superóxido y por ende el estrés oxidante (Sankaralingam et al., 2010).

Por ello es relevante usar moléculas que puedan disminuir el estado de estrés oxidante y evitar el desacoplamiento de la eNOS, entre estas moléculas se encuentra el sulfuro de hidrógeno.

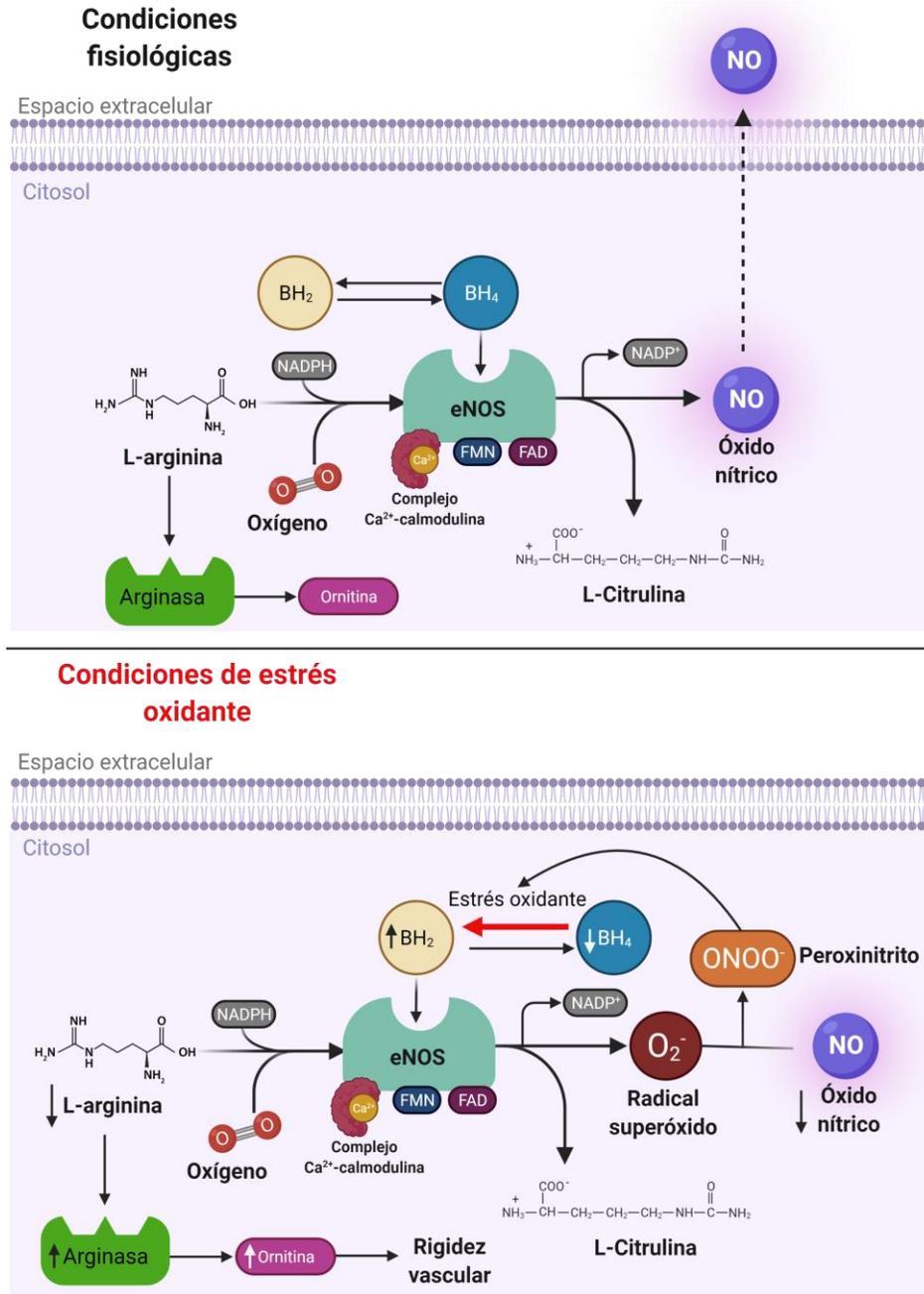


Figura 6. Desacople de la eNOS causado por el estrés oxidante. En condiciones fisiológicas, el BH₄ es cofactor de la eNOS para la producción de L-citrulina y NO. Además, la actividad de la arginasa se mantiene junto con la liberación de ornitina. En condiciones de estrés oxidante, moléculas como el peroxinitrito oxidan al BH₄ pasando a BH₂ la cual sustituye al cofactor BH₄ en la eNOS provocando una disminución de la producción de NO y aumenta la formación de O₂⁻ que, junto al NO forma peroxinitrito, aumentando el estado de estrés oxidante. Asimismo, aumenta la actividad de la arginasa, aumentando la formación de ornitina aumentando la rigidez vascular (Villalba et al., 2017)

Introducción

1.3. Sulfuro de hidrógeno

Años atrás, el H₂S se conocía por ser un gas tóxico capaz de inhibir a la enzima citocromo c oxidasa (Nicholls, 1975) y ser utilizado como un arma química en la Primera Guerra Mundial (Kumar et al., 2018). Una exposición a 300-500 ppm de H₂S conduce a un edema pulmonar y una exposición mayor a 500 ppm conduce rápidamente a una pérdida del conocimiento, interrupción en la respiración y, por ende, la muerte (Filipovic et al., 2018). Sin embargo, en 1996 se reportó que el H₂S puede ser sintetizado endógenamente y, además, cumple con un papel como neuromodulador (Abe & Kimura, 1996). Por lo que su estudio ha tomado gran relevancia en los últimos años.

1.3.1. Propiedades fisicoquímicas

El H₂S es un gas incoloro e inflamable con un característico olor a huevo podrido. En la siguiente tabla se resume las propiedades fisicoquímicas (tabla 2) (Wen et al., 2018; National Center for Biotechnology Information, 2022):

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del H₂S

Propiedades	Características
Solubilidad	En agua: 1g en 242 mL (20°C; solución saturada) Solventes lipofílicos: glicerol, gasolina, queroseno, sulfuro de carbono Solventes polares: metanol, acetona.
Acidez	Ácido débil
pKa	6.76 (37°C)
Momento dipolar	0.97 D
Densidad	1.36 kg/m ³
Disociación pH= 7.4 a 37°C	18.5% H ₂ S 81.5% HS ⁻
Permeabilidad	Atraviesa fácilmente células de todo tipo
Hidrólisis	H ₂ S ↔ H ⁺ + HS ⁻ ↔ 2 H ⁺ + S ²⁻
Dosis letal	>500ppm en humanos

Dadas las características fisicoquímicas del H₂S, se le considera como el 3^{er} gasotransmisor, junto al NO y el CO (monóxido de carbono) (Vandiver & Snyder, 2012). Las concentraciones de H₂S circulante en el plasma sanguíneo humano es de 10-100 μM mientras que en tejidos como el cerebro se incrementa entre 50-160 μM. La mayor parte de la producción de H₂S se da en los tejidos vasculares. Un estudio en rata reveló que en la aorta torácica se encuentra más cantidad de H₂S que en la vena porta (Wen et al., 2018; Zhao et al, 2001). El 81.5% del H₂S se encuentra como grupo HS⁻. Este grupo puede formar enlaces covalentes, reacción conocida como persulfuración (Filipovic et al., 2017).

1.3.2. Biosíntesis y metabolismo

La síntesis de H₂S puede darse por 2 vías: la vía enzimática y la vía no enzimática (Figura 7). En la vía enzimática se encuentra la participación de la cistationina-β-sintasa (CBS), cistationina-γ-liasa (CSE) y la 3-mercaptopiruvato sulfurotransferasa (3-MST) (Zaorska et al., 2020). La CBS y la CSE son enzimas dependientes de PLP que están localizadas en el citosol y comprenden la ruta de transulfuración, mientras que la 3-MST, la cual es independiente de PLP, se encuentra en la mitocondria (Cao et al. 2018).

La enzima CBS se expresa predominantemente en el cerebro y en el riñón, y su regulación depende de varios cofactores y activadores, por ejemplo, la unión alostérica de S-adenosilmetionina (SAM) protege a la CBS de la proteólisis e *in vitro* se ha comprobado que aumenta la actividad de la enzima. Otra forma de regular su actividad es mediante las modificaciones postraduccionales como es la sumoilación por parte de la proteína modificadora similar a la ubiquitina-1 (SUMO-1) (Renga, 2011; Hung & Moore, 2015).

La distribución de la CSE es mayor a la enzima CBS, ubicándose mayormente en el intestino delgado, estómago, vena porta, aorta torácica, páncreas, útero, etc. Se ha reportado que la CSE es la principal enzima de H₂S en el hígado. La modulación de su actividad es por el complejo calcio-calmodulina. Sin embargo, esto aún no está entendido completamente, ya que algunos estudios revelan que este complejo no afecta la producción de H₂S por parte de la CS; sin embargo, también se ha reportado que sufre de mecanismos de sumoilación (Hung

Introducción

& Moore, 2015; Renga et al., 2009). Por último, la 3-MST se ha estudiado en el epitelio tubular proximal del riñón, hepatocitos, células cardiacas y neurogliales. Su actividad está regulada por calcio y puede inhibirse por aspartato (inhibidor de la CAT). Por otro lado, el estado REDOX influye en su regulación dada la cantidad de cisteínas que contiene en su sitio catalítico (al menos 3) (Hung & Moore, 2015).

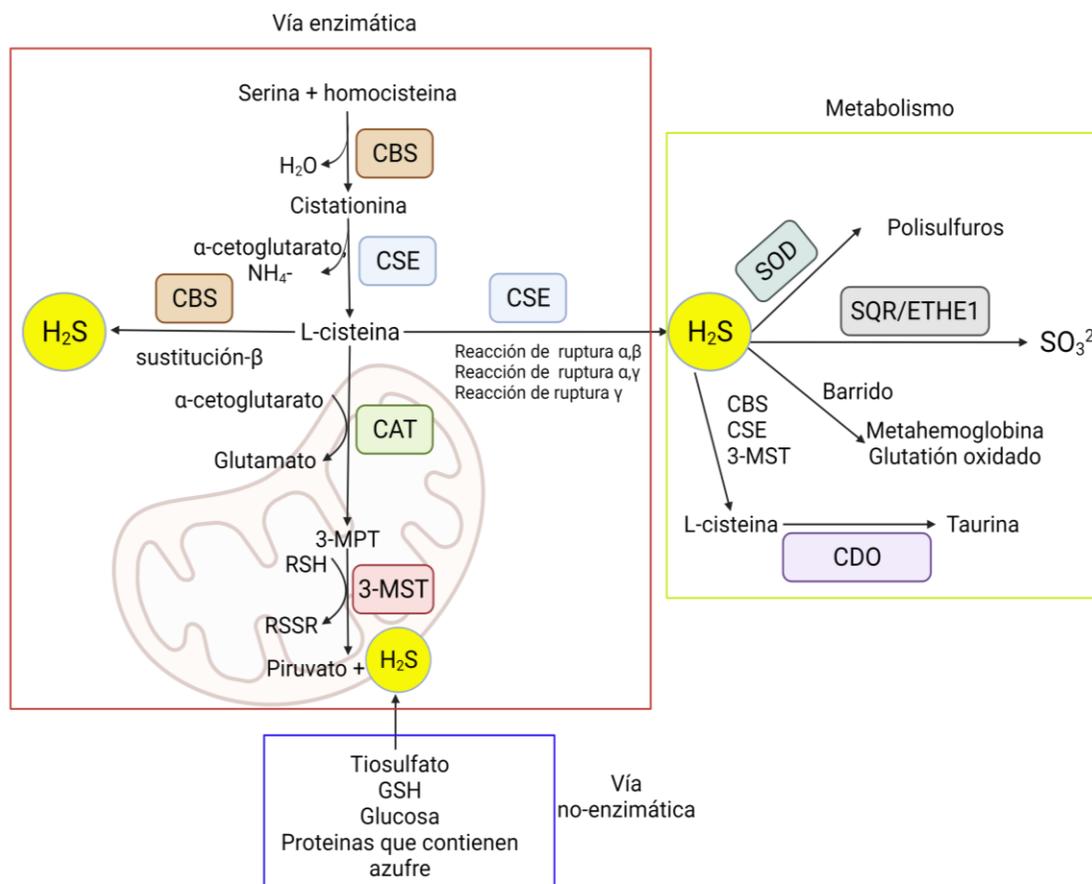


Figura 7. Biosíntesis y metabolismo del H₂S. En la caja naranja se engloba los 3 mecanismos enzimáticos por los cuales se forma el H₂S. En la caja morada se muestra la vía no enzimática por la cual se libera el gas. En la caja amarilla se muestran las diferentes rutas por las cuales se metaboliza el H₂S. SOD: superóxido dismutasa, CAT: cisteína aminotransferasa, SQR: sulfuro quinona oxidorreductasa, ETHE1: persulfuro dioxigenasa, CDO: cisteína dioxigenasa, GSH: glutatió, RSH: grupos tioles, RSSR: compuestos disulfuro (modificado de Lv et al., 2020).

La producción no enzimática de H₂S se lleva a cabo a través de una reducción química del azufre de sulfanos (los cuales son átomos de azufre que se encuentran unidos covalentemente y que, debido a su inestabilidad liberan azufre libre) que requiere de los coactivadores NADH

Introducción

y NADPH (Cao et al., 2019; Wood, 1987). Por lo que a partir de persulfuros, tiosulfatos y polisulfuros se puede obtener H₂S y otros metabolitos (Cao et al., 2019). Uno de los factores que promueven la producción de H₂S por la vía no enzimática es la hiperglucemia (Wang, 2002). Otra fuente de H₂S es a partir de la microbiota. Algunas bacterias de la microbiota pueden tomar polisulfuros orgánicos provenientes de la dieta (ajo, cebolla, etc.) para liberar H₂S. Esta vía proporciona una fuente de energía para algunas células epiteliales y de la lámina propia (Wallace et al., 2017).

El H₂S se metaboliza por 3 vías principales: 1) por oxidación mitocondrial pasando a tiosulfato y posteriormente a sulfito y sulfato; siendo éste el principal producto final de metabolismo del H₂S; 2) por metilación a dimetilsulfuro, en el citosol, por medio de la enzima tiol-S-metiltransferasa; y 3) por unión a la hemoglobina llevando a la formación de sulfohemoglobina o metahemoglobina (Yu et al., 2014).

1.3.3. Persulfuración de proteínas

El H₂S es una molécula que puede reaccionar con residuos de cisteína de algunas proteínas; modificación postraducciona que se le conoce como “persulfuración” (Paul & Snyder, 2015). De acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, el H₂S en condiciones fisiológicas (pH=7.4) se encuentra disociado en 3 entidades diferentes: H₂S (75%), HS⁻ (20%) y S²⁻ (~5%) (dado su pKa de 6.77), permitiendo que se lleve a cabo las reacciones de persulfuración. Para que esto ocurra, los residuos de cisteína deben poseer un pKa bajo.

Estrictamente, el H₂S no puede actuar directamente con los grupos tioles (-SH) sino en grupos oxidados como son: ácidos sulfónicos (-SOH), cisteínas nitrosadas en S (-SNO) o proteínas con disulfuros de cisteína (-S-S-) (Mustafa et al., 2009). Igualmente, los productos de la reacción de persulfuración pueden reaccionar directamente con los grupos tioles mediante una reacción de desplazamiento (figura 8) (Zhang, 2017; Meng et al., 2017).

El resultado de la persulfuración es la formación de grupos hidropersulfuros (-SSH). Estos grupos difieren de los grupos tioles al tener una capacidad nucleófila más fuerte lo que conlleva a una mayor reactividad química. Al contar con un pKa bajo, permite que los grupos

Introducción

-SSH se conviertan en donantes de hidrógeno más activos que los -SH. Asimismo, los radicales provenientes de los grupos -SHH (el grupo pertilo RSS•) tienen mayor estabilidad siendo un importante factor antioxidante (Zhang et al., 2017).

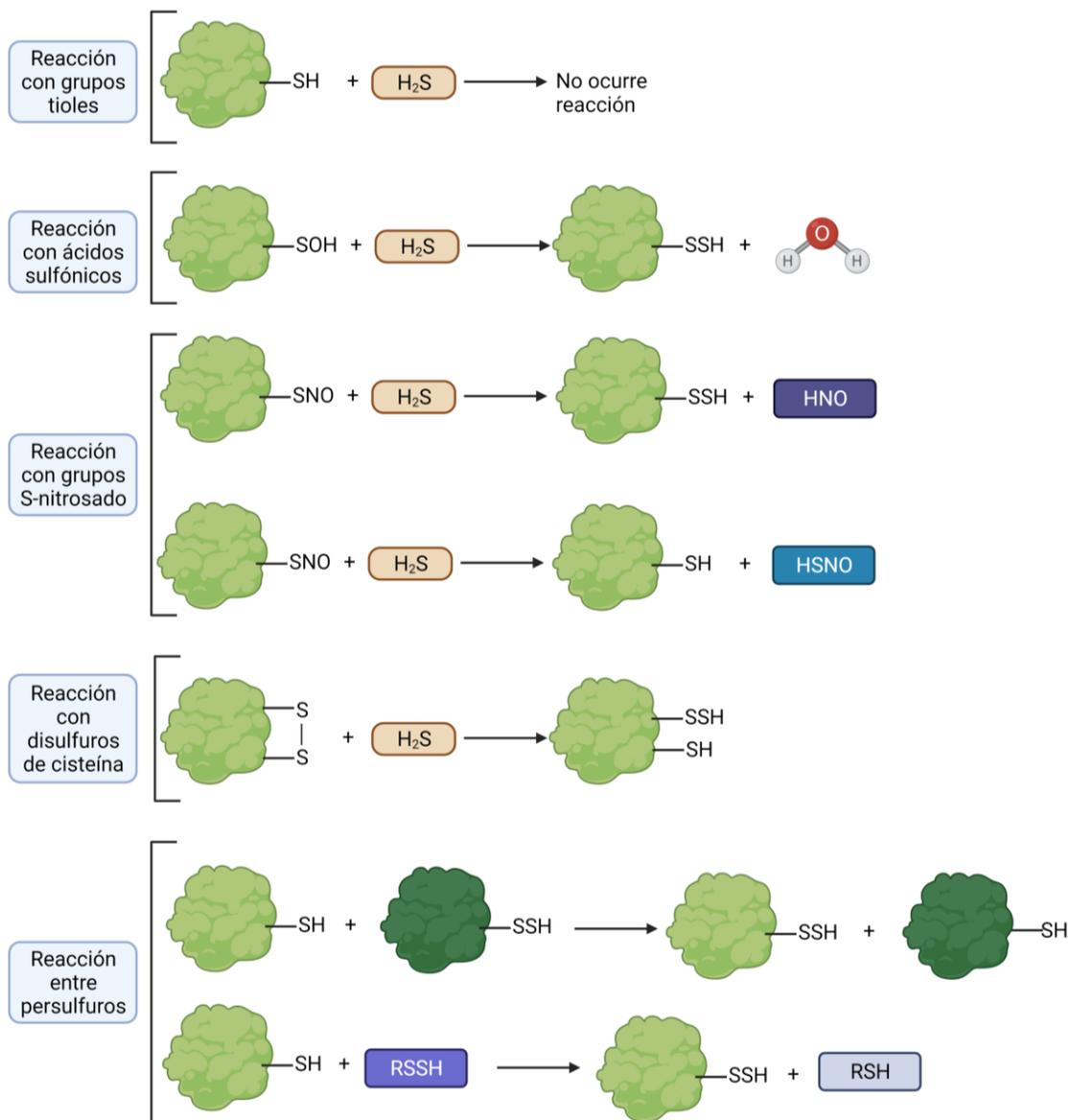


Figura 8. Reacciones de persulfuración por el H₂S. Los grupos con ácidos sulfónicos, con grupos S-nitrosado y con disulfuros de cisteína pueden reaccionar con el H₂S de manera directa. Nótese que el H₂S no puede reaccionar con los grupos tioles *per se*, pero si los grupos que han sido hidropersulfurados pueden interactuar directamente con grupos tioles. HNO: nitroxilo; HSNO: ácido tionitroso. RSSH: hidropersulfuros. RSH: tioles. (Zhang et al., 2017).

Diferentes publicaciones indican que las reacciones de persulfuración son las responsables de los efectos biológicos por parte del H₂S y sus donadores. En el sistema cardiovascular, se

Introducción

encuentran diferentes enzimas, receptores, factores de transcripción y canales iónicos que son susceptibles a la persulfuración (figura 9). Con relación a los canales, particularmente el canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}), sufre una reacción de persulfuración en la subunidad Kir6.1. El efecto final es la hiperpolarización y vasorrelajación de los vasos sanguíneos (Mustafa et al., 2011).

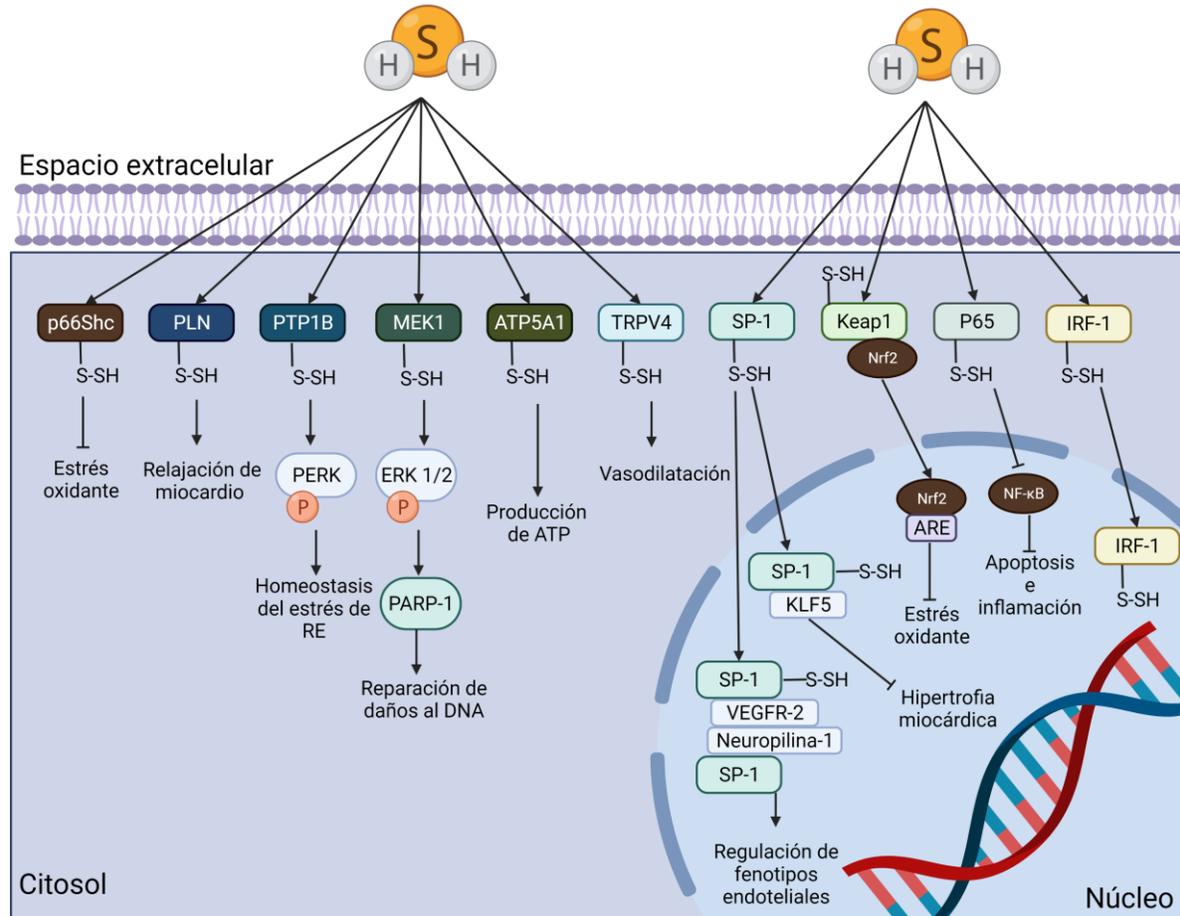


Figura 9. Persulfuración en proteínas relacionadas con el sistema cardiovascular. El H₂S produce efectos en el sistema cardiovascular mediante la reacción de persulfuración de proteínas y genes, tanto en el citosol como en núcleo. PLN: fosfolambano; PTP1B: proteína tirosina fosfatasa 1B; ATP5A1: Subunidad α de la ATP sintasa; IRF-1: factor regulador de interferón-1; Keap1: Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch; MEK1: cinasa 1 regulada por señal extracelular activada por mitógeno; NF- κ B: factor nuclear κ B; Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2; SP-1: proteína específica-1; TRPV4: Potencial de receptor transitorio del canal catiónico subfamilia V miembro 4. VEGFR-2: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular tipo 2. KLF5: factor 5 Kruppel-like (Meng et al., 2017).

1.3.4. Efectos en el sistema cardiovascular

Las concentraciones de H₂S en el sistema cardiovascular son relevantes debido a que las variaciones en las concentraciones se han correlacionado con diversas enfermedades, como la insuficiencia cardiaca, la isquemia miocárdica y la aterosclerosis (Pan et al., 2017). Uno de los primeros reportes de los efectos de H₂S fue en el sistema cardiovascular. Al respecto el H₂S produce relajación en el MLV (Hosoki & Kimura, 1997). Dicho efecto involucra la apertura de los canales de K_{ATP} (Zhao et al., 2001). Asimismo, en el corazón, el H₂S produce un efecto inotrópico y cronotrópico negativo (Geng et al., 2004).

A pesar de que se ha reportado que las 3 enzimas sintetizadoras de H₂S se encuentran en el sistema cardiovascular, la CSE es la enzima más implicada en la homeostasis del sistema cardiovascular junto a la 3-MST, la cual es la encargada de la producción de H₂S en el endotelio vascular (Pan et al., 2017). Se ha reportado que el H₂S tiene un papel importante en la relajación dependiente de endotelio. En ratones KO para la enzima CSE se encontró que en esos animales carecían de la relajación dependiente del endotelio inducida por un agonista colinérgico, como es la metacolina, en las arterias mesentéricas (Wen et al., 2018). Aunado a lo anterior, la misma delección de la enzima CSE en aortas 1) disminuye los niveles de H₂S en el suero, 2) disminuye la relajación dependiente de metacolina y 3) aumenta la contracción en respuesta a noradrenalina (Yang et al., 2008). Dichos hallazgos dan cuenta de la importancia del H₂S en la función vascular. Los mecanismos por los cuales el H₂S tiene efectos en la función vascular aún no están descritos por completo, sin embargo, se plantean algunos mecanismos, principalmente por la persulfuración de canales iónicos en el endotelio y en el MLV (Lv et al., 2020) (Figura 10).

El H₂S tiene una acción cardioprotectora, la cual se descubrió al disminuir la producción de H₂S endógeno y encontrar un aumento en el tamaño del infarto de miocardio inducido por el ligamento de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (Zhu et al., 2007). Por otro lado, en la clínica, se encontraron bajos los niveles plasmáticos de H₂S en pacientes con enfermedad coronaria e insuficiencia cardiaca (Nagpure & Bian, 2016; Shen et al., 2015).

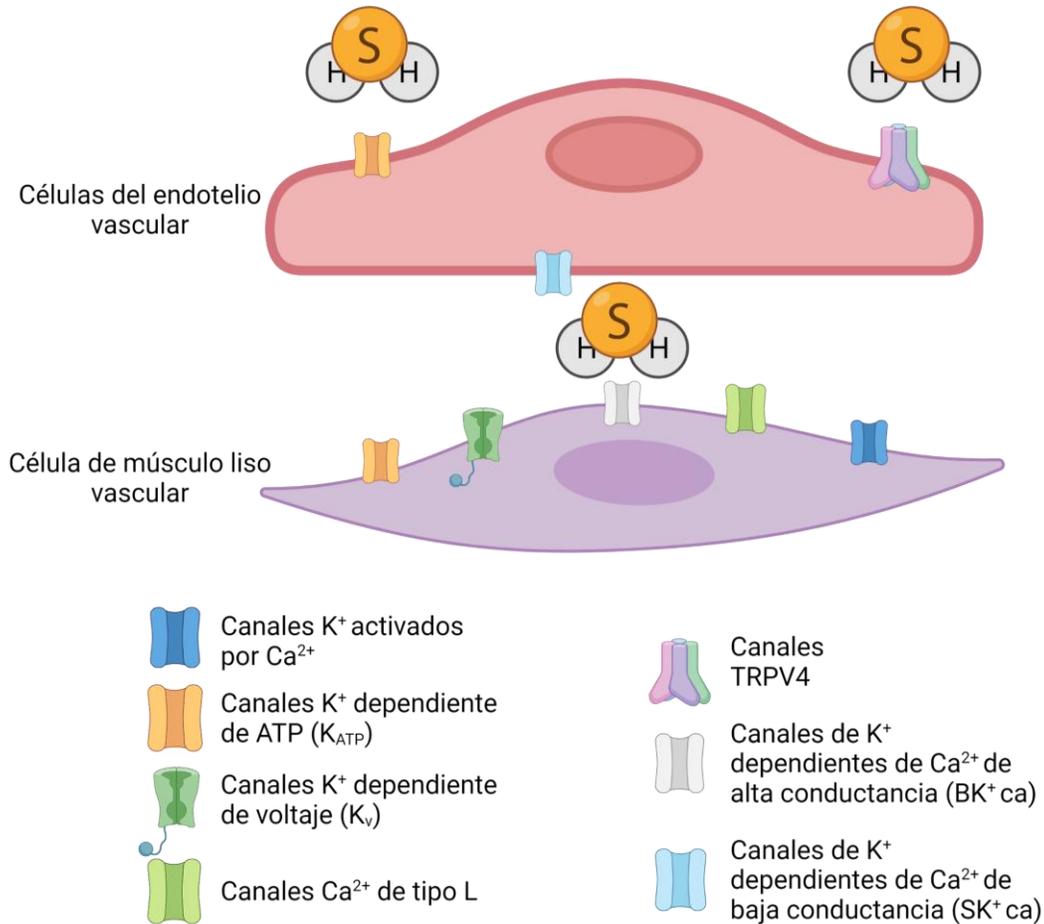


Figura 10. Mecanismos de vasorrelajación por el H_2S . Mediante las reacciones de persulfuración a diferentes residuos de los canales que se muestran en la imagen, el H_2S induce vasorrelajación (Lv et al., 2020).

Actualmente, han surgido diversos estudios en donde el H_2S participa como modulador de los procesos inflamatorios e inmunitarios durante diferentes enfermedades cardiovasculares, cumpliendo como regulador en: 1) la activación y proliferación de células T, 2) la apoptosis de las células polimorfonucleares, 3) la adhesión y la infiltración de leucocitos y 4) la liberación de citocinas inflamatorias (Pan et al., 2017).

1.3.5. Alteraciones en la producción de H_2S postTCE

Después de un TCE, las enzimas productoras de H_2S disminuyen su expresión en estructuras del sistema nervioso central que regulan la presión arterial postTCE. Por ejemplo, en el hipotálamo, las tres enzimas productoras de H_2S disminuyen su expresión. En el tallo cerebral

Introducción

disminuyen dos de las tres enzimas productoras de H₂S: la CBS y la CSE. Dicha disminución en ambas estructuras se mantiene hasta 28 días postTCE (Huerta de la Cruz et al., 2022b). La disminución de la enzima CBS también ha sido reportada en otras estructuras cerebrales como la corteza cerebral y el hipocampo. Mientras que, en la sangre los niveles de H₂S se encuentran disminuidos a partir de 6 horas postTCE y se mantienen disminuidos hasta 7 días de evaluación, lo que surge que la disminución de las enzimas en dichas estructuras está involucrada en la hipertensión arterial postTCE (Zhang et al., 2013). Sin embargo, aún falta detallar la conexión entre un posible cambio de expresión de las enzimas productoras de H₂S en los vasos sanguíneos y su relación con la disfunción endotelial postTCE.

1.3.6. Efecto de donadores de H₂S postTCE

Los donadores de H₂S pueden dividirse en donadores de liberación rápida o de liberación lenta. Entre los donadores de liberación rápida están las sales de sulfuro; las cuales son el sulfhidrato de sodio (NaHS) y el sulfuro de sodio (Na₂S). Por otra parte, los donadores de liberación lenta son moléculas sintéticas como es el GYY 4137, polisulfuros, reactivo de Lawesson, entre otros (Powell et al., 2018). Otra forma de clasificar a los donadores de H₂S es por sus características químicas. En este sentido, existen donadores de H₂S: 1) inorgánicos, 2) orgánicos y 3) naturales (Szabo & Papapetropoulos, 2017). Diversos donadores han sido utilizados en distintos modelos de lesión cerebral, por ejemplo: el GYY 4137 se reportó que incrementa las vías de BDNF-TrkB (funciones neuroprotectoras) y NGF-TrkA (esenciales para el crecimiento de neuronas simpáticas y sensoriales), y disminuyendo la vía de proNGF-p75NRT-sortilina (apoptosis) en modelos de lesión cerebral isquémica (Chen et al., 2008; Gao et al., 2018).

Diversos estudios han reportado que el tratamiento farmacológico con NaHS tiene diferentes efectos sobre el daño inducido por el TCE: (1) disminución del volumen de lesión en la corteza ipsilateral (Zhang et al., 2014); (2) aumento del nivel de H₂S del tejido cerebral y de las actividades antioxidantes endógenas (Jiang et al., 2013); (3) disminución de ROS en el tejido cerebral (Jiang et al., 2013); (4) un efecto neuroprotector sobre el deterioro de la memoria inducida por el TCE (Karimi et al., 2017); y (5) restauración de la función mitocondrial e inhibición de la autofagia por la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR (Xu

Introducción

et al., 2017). Aunado a esto, se reportó que el NaHS es capaz de revertir la disfunción endotelial inducida por un modelo de resistencia a la insulina (Silva-Velasco, 2019). Estos hallazgos se relacionan con lo encontrado en un modelo de ratones diabéticos (Ng et al., 2017) y en un modelo de ratones hipertensos inducida por angiotensina II (Al-Magableh et al., 2015). De acuerdo con lo anterior es factible pensar que el tratamiento con NaHS podría tener efecto en los diferentes eventos desencadenados postTCE.

2. Justificación

La disfunción vascular desempeña un papel importante en la alteración vascular sistémica que resultan del TCE y se asocia a una alteración de las enzimas productoras de H₂S. Se sabe que la administración de un donador exógeno de H₂S previene la hipertensión inducida por TCE y revierte la disfunción endotelial en algunos modelos de enfermedades metabólicas. Tomando en cuenta que después de un TCE se presenta una disfunción endotelial similar a la detectada en enfermedades metabólicas, es factible pensar que la administración de un donador de H₂S prevendrá las alteraciones vasculares inducidas por un TCE, evitando, principalmente, el aumento en el estrés oxidante y los cambios enzimáticos.

3. Hipótesis

En ratas sometidas a un TCE severo, el tratamiento subcrónico con NaHS (donador de H₂S), evitará: 1) el incremento en la presión arterial y frecuencia cardiaca, la disfunción vascular periférica y el incremento en las ROS; 2) los cambios en la expresión proteínica de las enzimas productoras de H₂S y la sintasa de óxido nítrico endotelial.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar en ratas sometidas a un TCE severo, el tratamiento subcrónico con NaHS (donador de H₂S) en la presión arterial y frecuencia cardiaca, la función vascular periférica y el nivel de ROS, así como la expresión de las enzimas productoras de H₂S y la sintasa de óxido nítrico endotelial.

4.2. Objetivos específicos

En animales sometidos a un TCE severo, evaluar el efecto de la administración subcrónica del donador NaHS en:

1. Las variables de frecuencia cardiaca, presión arterial sistólica, diastólica y media, *in vivo*.
2. La función vascular en aortas torácicas, *in vitro*.
3. El nivel de ROS en aortas torácicas.

4. La expresión de las enzimas productoras de H₂S: CSE, CBS, 3-MST, así como la eNOS y p-eNOS en aortas torácicas.

5. Materiales y métodos

5.1. Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar cuyo peso varió entre 250 a 315 g. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico transparente bajo condiciones ambientales controladas, esto es, ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con una temperatura de 22 a 25°C, con acceso a alimento y agua *ad libitum*. El protocolo se realizó bajo la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el Comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) con número 0326-22.

5.2. Modelo de TCE: lesión lateral por percusión de fluidos

Previamente a la inducción del TCE, se llevó a cabo la craneotomía correspondiente. Para ello, los animales se anestesiaron con ketamina (80 mg/kg; ip) /xilacina (17 mg/kg; im). Cuando los animales perdieron el reflejo flexor de las patas traseras (anestesia profunda) se montaron sobre el marco estereotáxico y se realizó una incisión de tipo sagital de aproximadamente 1.5 cm siguiendo la línea media entre las orejas hacia la nariz y se removió el periostio que cubre al cráneo utilizando un hisopo de algodón estéril. Se colocó un tornillo de acero inoxidable en la parte lateral anterior a bregma que funcionaba como sostén temporal al casco de acrílico.

Se realizó un craneotomía de 5 mm de diámetro con ayuda de un trépano en las siguientes coordenadas: -5.00 mm de bregma, -4.00 mm de la sutura sagital. Se fijó el “sello *Luer*” en la circunferencia de la craneotomía. Se colocó acrílico dental en forma de casco para fijar todos los componentes y después de 90 minutos de la anestesia profunda se llevó a cabo la inducción del TCE.

El equipo con el que se indujo el traumatismo consiste en un depósito cilíndrico de plexiglás lleno de solución salina isotónica. En el momento de la lesión, el tubo se conectó al sello *Luer* colocado previamente en el cráneo del animal y un péndulo de metal golpea al pistón desde un determinado ángulo provocando un pulso de presión que impacta la duramadre. La intensidad del impacto se registró en atmósferas con la ayuda de un transductor. Un TCE

Materiales y métodos

leve se obtuvo con un rango de presión de 1.8 a 2.39 atm, un TCE moderado de 2.4 a 2.8 atm y un TCE severo con un golpe mayor a 2.8 atm (McIntosh, 1989). Para el presente estudio se ajustó el equipo para obtener un rango de presión mayor o igual a 2.8.

Después de la inducción del TCE, se retiró el casco de acrílico y se suturó la piel. Los animales se colocaron en jaulas acrílicas individuales y se aplicó tramadol (20 mg/kg; sc.) 15 minutos después de la inducción del TCE para evitar el dolor inducido por la cirugía.

5.3. Diseño experimental

Se utilizaron 30 animales, los cuales siguieron el siguiente protocolo experimental (Figura 11). Se contaron con 3 grupos experimentales con una n de 10 animales cada uno:

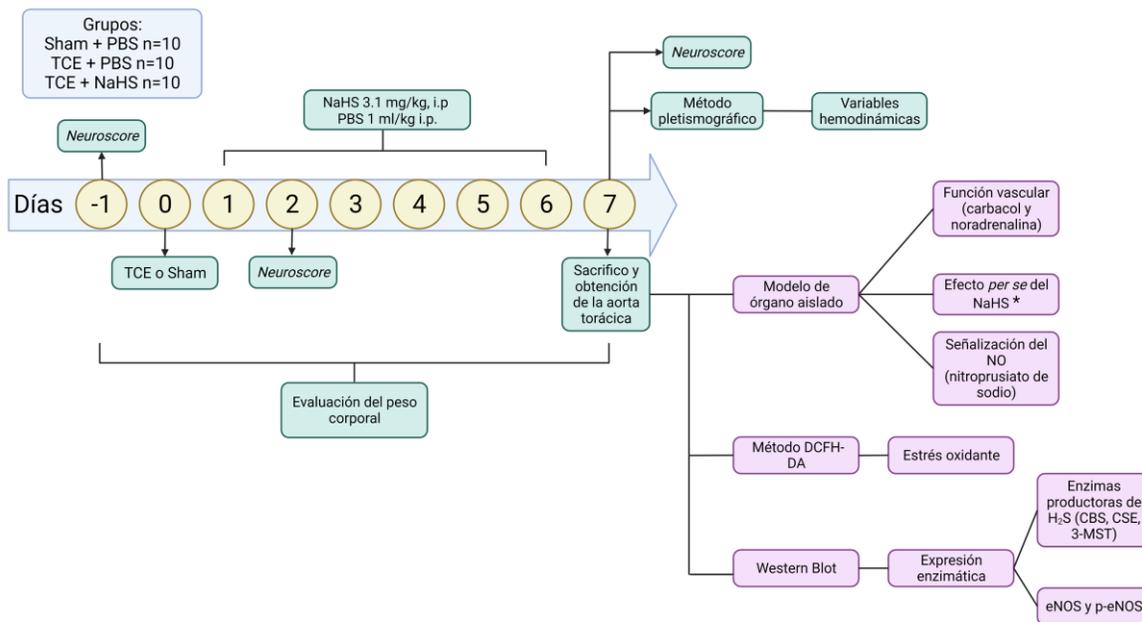


Figura 11. Diseño experimental (ver texto para detalles).

TCE+NaHS. Se sometieron a una craneotomía y a la inducción de un TCE severo (día 0). A las 24 horas postTCE se inició el tratamiento con NaHS a la dosis de 3.1 mg/kg vía ip. El tratamiento se repitió cada 24 horas durante 7 días consecutivos. A dichos animales se les evaluó su actividad sensoriomotora 24 horas antes del traumatismo, al día 2 postTCE y al día 7 postTCE; La evaluación del peso se realizó diariamente. En el día 7 postTCE se midieron las variables de frecuencia cardíaca y presión arterial de los animales y 24 horas después de la última administración se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron las aortas torácicas

Materiales y métodos

para evaluar la función vascular y la estimación de ROS (n=6) y la expresión de proteínas por Western Blot (n=4).

TCE+PBS. Se manipuló igual que el grupo anterior excepto que no recibieron el NaHS, sino PBS a un volumen de 1 mL/kg por vía ip. cada 24 horas por 7 días.

Sham + PBS. Se manipuló igual que el grupo TCE + PBS excepto que no se sometieron al trauma.

5.4. Neuropuntuación

La neuropuntuación (*Neuroscore*, en inglés) es una escala de evaluación de la función sensoriomotora (Figura 12). Se evaluó cada una de las siguientes pruebas: (1) contraflexión anterior [izquierda (I) y derecha (D)] mediante la suspensión por la cola: (2) pulsión lateral (I-D) mediante su nivel de resistencia; (3) extensión de extremidades posteriores (I-D); y (4) la capacidad para mantenerse sobre un plano inclinado a diferentes ángulos (35° - 75°), de tres formas: vertical y lateral (I-D). La puntuación otorgada en cada prueba fue desde 4 puntos para una función normal a 0 puntos si el animal perdió completamente la función (Pierce et al., 1998; McIntosh, 1989).

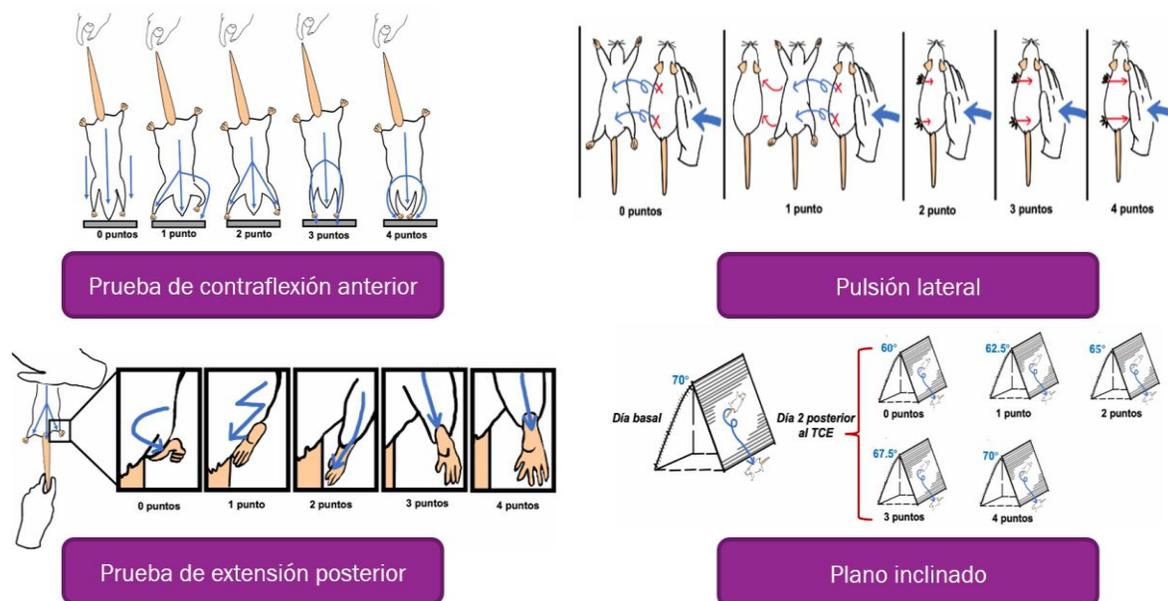


Figura 12. Pruebas correspondientes a la evaluación de la función sensoriomotora. Imágenes cortesía de Marysol Segovia.

Materiales y métodos

La neuropuntuación dió la información del daño sensoriomotor inducido por el TCE. Un puntaje de 28 a 26 puntos se consideró una actividad sensoriomotora normal, 25 a 20 se consideró un daño leve, 16 a 19 se consideró un daño moderado, y un puntaje ≤ 15 se consideró un daño severo (Pierce et al., 1998; McIntosh, 1989).

5.4. Determinación de la presión arterial y frecuencia cardiaca

Se determinaron las siguientes variables: frecuencia cardiaca (FC), presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM). Las variables fueron medidas por el método pletismográfico usando un medidor de presión arterial automático LE 5001 (Letical, PanLab, Barcelona, España). Para tal fin, los animales fueron inmovilizados 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 colocó 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 a través de un sensor. Los animales fueron habituados a los restrictores de movimiento dos días consecutivos antes del día de la evaluación.

5.5. Evaluación de la función vascular mediante el modelo de órgano aislado

El modelo de órgano aislado se utilizó para determinar las respuestas funcionales de la aorta torácica. Para llevar a cabo este modelo, los animales se sacrificaron por decapitación, y se extrajeron las arterias torácicas. Se procedió a la remoción del tejido adiposo perivascular en solución de Krebs-Ringer con la siguiente composición (mM): NaCl (119.5), dextrosa (12), NaHCO₃ (24.9), KCl (4.74), MgSO₄ 7H₂O (1.18), KH₂PO₄ (1.18), CaCl 2H₂O (2.5), and EDTA (0.026). Posteriormente los vasos sanguíneos se cortaron en anillos de una longitud de aproximadamente 3 mm. Los anillos se montaron en ganchos de nicrom para fijarlos en las cámaras de órgano aislado que contenían solución fisiológica de Krebs-Ringer a 37°C con una aeración de carbógeno (95% O₂; 5% CO₂). Los ganchos de nicrom se conectaron a un transductor Grass FT03 para el registro de las respuestas vasculares.

Materiales y métodos

El protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera (Figura 13). Los anillos iniciaron con una tensión de 2.5 gramos junto a un periodo de estabilización de 30 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la capacidad de contracción con noradrenalina a una concentración de 1×10^{-6} M. Se realizó un lavado y se expusieron nuevamente con noradrenalina a la misma concentración para observar la reproducibilidad de la respuesta. Para observar la viabilidad del endotelio vascular se añadió acetilcolina a una concentración de 1×10^{-5} M. En los anillos que presentaron una respuesta vasorrelajante mayor o igual al 80%, se consideró que el endotelio se encontraba intacto, y se continuó con el protocolo. Posteriormente, los anillos se expusieron a cloruro de potasio (KCl) 80 mM para alcanzar la despolarización máxima del músculo liso vascular y al alcanzar la meseta se llevó a cabo un lavado. A continuación, se realizó la evaluación de las respuestas vasorrelajantes inducidas por carbacol. Para ello se expusieron nuevamente los anillos con noradrenalina 1×10^{-6} M y se inició la evaluación del efecto concentración-respuesta mediante la exposición de concentraciones crecientes acumulativas de carbacol desde 1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M. Al concluir la exposición a carbacol, se realizó un lavado y se procedió a evaluar el efecto concentración-respuesta mediante la exposición de concentraciones crecientes acumulativas de noradrenalina desde 1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M. Para evaluar el efecto concentración-respuesta de la exposición a carbacol y noradrenalina, se obtuvieron dos parámetros: la potencia, que es la concentración del fármaco requerida para producir un efecto, en este caso el 50% del efecto máximo y el efecto máximo, que es la máxima respuesta que se puede esperar del fármaco.

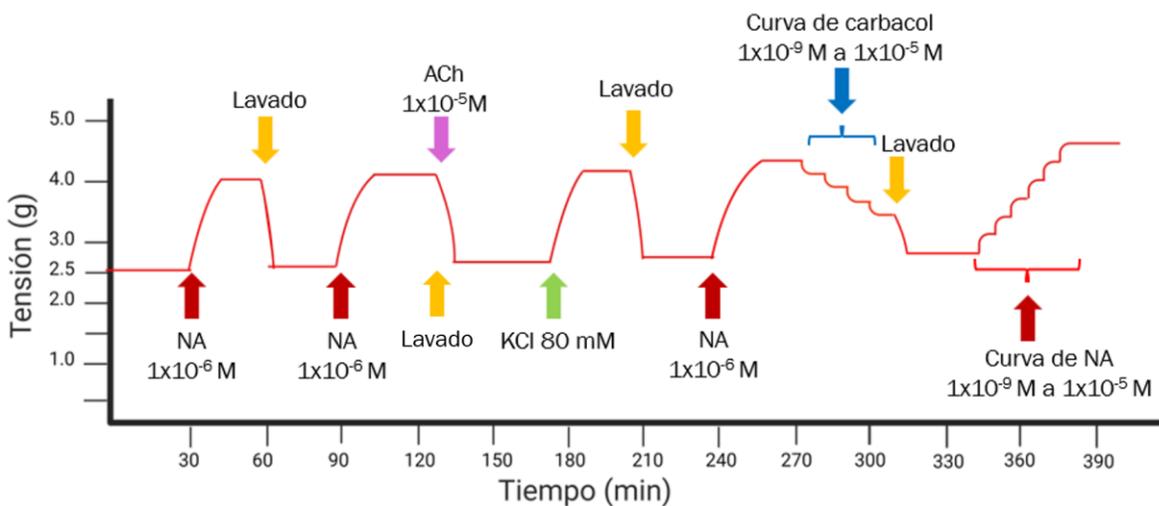


Figura 13. Ejemplo de un registro obtenido de un anillo de aorta (no escala). Se comienza con una tensión de 2.5 g durante 30 min para añadir la NA (noradrenalina) hasta

Materiales y métodos

alcanzar la meseta, posteriormente se lava la cámara para regresar a la tensión inicial y después de 30 min se añade nuevamente NA hasta la meseta y se añade ACh (acetilcolina), se vuelve a lavar la cámara y se añade una solución de KCl (cloruro de potasio) 80 mM hasta alcanzar la meseta, posteriormente se lava la cámara y se añade NA hasta alcanzar la meseta y se añaden concentraciones crecientes de carbacol. Al terminar se lava la cámara y finalmente, se añaden concentraciones crecientes de NA.

5.6. Efecto *per se* del H₂S y curvas de relajación inducidas por nitroprusiato de sodio

El protocolo para evaluar el efecto *per se* del H₂S se llevó a cabo de manera similar a las curvas de carbacol y noradrenalina hasta la estimulación con KCl 80mM, posterior al lavado, se llevó a cabo la evaluación de las respuestas vasorrelajantes inducidas por NaHS. Para ello se expusieron nuevamente los anillos a noradrenalina 1x10⁻⁶M y se inició la evaluación del efecto concentración-respuesta mediante la adición de concentraciones crecientes acumulativas de NaHS desde 1x10⁻⁶ M a 1x10⁻²M. Al concluir la exposición a NaHS se prosiguió a dar un último lavado.

Para realizar las curvas de relajación inducidas por nitroprusiato se procedió de manera similar a las curvas de NaHS. Después de estimular a las aortas con KCl 80mM y su respectivo lavado, se llevó a cabo la evaluación de las respuestas vasorrelajantes inducidas por nitroprusiato de sodio. Para ello se expusieron nuevamente el anillo con noradrenalina 1x10⁻⁶M y se inició la evaluación del efecto concentración-respuesta mediante la adición de concentraciones crecientes acumulativas de nitroprusiato de sodio desde 1x10⁻⁹ M a 1x10⁻⁵ M. Al concluir la curva se prosiguió a dar un último lavado. Para ambas experiencias fue obtenido la potencia y el efecto máximo.

5.7. Determinación del estrés oxidante mediante la cuantificación de las ROS

Las ROS se cuantificaron empleando el método del diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA), el cual es desesterificado por la presencia de peróxido de hidrógeno produciendo una molécula más oxidada (2',7'-diclorofluoresceína o DCF), la cual es capaz de fluorescer (Aranda et al., 2013). La DCF tiene una longitud de excitación a 488 nm y una longitud de emisión de fluorescencia máxima a los 525 nm. Para ello, se tomó 1 µL del homogeneizado y se colocó en 195 µL de regulador TRIS: HEPES (18:1). La fracción diluida

Materiales y métodos

se incubó con 25 μ L de DCFH-DA por 1 h a 37 °C en agitación constante. La reacción se detuvo colocando las muestras en hielo, inmediatamente se tomó la lectura de la fluorescencia en un espectrofotómetro, a longitudes de onda de 488 nm de excitación y 525 nm de emisión. Los resultados se expresaron como unidades relativas de fluorescencia (URF)/ μ g de tejido.

5.8. Expresión proteínica de las enzimas CBS, CSE, 3-MST, eNOS y p-eNOS en aorta torácica: Western Blot

La técnica de Western Blot fue empleada para la determinación de la expresión de las proteínas de interés. Las muestras de las aortas torácicas fueron colocadas en tubos Eppendorf para su almacenamiento a -70°C hasta su análisis. Las muestras se homogeneizaron en 200 μ L de amortiguador cOmplete (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 100-x 1%, deoxicolato de sodio 5% y SDS 0.1%) que contiene en su composición inhibidores de proteasas (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich; Cat. No. 4693159001) y fosfatasas (PhosSTOP, EASYpack, phosphatase inhibitor cocktail: Sigma-Aldrich; Cat. No. 4906845001). Posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada a 4°C y el sobrenadante fue recolectado y almacenado a -70°C hasta la cuantificación de proteínas.

La cuantificación se realizó mediante el método de Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 1; Bio-Rad; Cat. No 5000201) y se tomaron 50 μ g de proteína total. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis para la separación de las proteínas en un gel SDS-PAGE al 10% durante 90 min a 120 V y posteriormente, la transferencia a una membrana de PVDF a 70 V y con una duración dependiente de las enzimas (para las enzimas de H₂S fue por 90 minutos y para la eNOS y p-eNOS 120 minutos). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 al 0.1% por 80 minutos. Subsecuente al bloqueo, se llevó a cabo la incubación con los anticuerpos primarios contra las enzimas CBS (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-133154), CSE (dilución 1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-365381), 3-MST (dilución 1:1000; Sigma-Aldrich; Cat. No. HPA001240) y contra la enzima eNOS (dilución 1:800; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-376751) y p-eNOS Ser¹¹⁷⁹ (dilución 1:1000; Life technologies;

Materiales y métodos

Cat. No. 36-9100) durante toda la noche. La proteína que se utilizó como control de carga para normalizar los niveles de expresión de proteínas fue la β -actina (anti- β actina dilución 1:10000; GeneTex; Cat. No. GTX5512). Posteriormente, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente: anti-mouse (dilución 1:7000; GeneTex; Cat. No. GTX21311-01) para la β -actina, las enzimas CBS y CSE y eNOS; y anti-rabbit para la enzima 3-MST y p-eNOS (dilución 1:5000; GeneTex; Cat. No. GTX213110-01). La lectura de los blots se realizó mediante la técnica de quimioluminiscencia (ChemiDoc™ XRS+ ImagingSystem, Bio-Rad, CA). El análisis de las bandas se realizó por densitometría (ImageLab™, Bio-Rad, CA, EUA).

5.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado en el presente proyecto se encuentra resumido en la siguiente tabla (tabla 3):

Tabla 3. Pruebas estadísticas utilizadas para cada experimento.

Prueba	Estadístico
	Sham+PBS vs TCE+PBS vs TCE + NaHS
Frecuencia cardíaca y presión arterial	ANOVA 1 vía <i>post hoc</i> Tukey $p < 0.05$
Evaluación del peso	ANOVA 2 vías <i>post hoc</i> Tukey $p < 0.05$
Neuropuntuación	ANOVA 2 vías /ANOVA 1 vía de medidas repetidas <i>post hoc</i> Tukey $p < 0.05$
Estrés oxidante	Kruskal-Wallis <i>post hoc</i> Tukey $p < 0.05$
Función vascular y curvas de NaHS y SNP	Regresión no lineal de una curva logística de 4 parámetros
Western Blot	ANOVA 1 vía <i>post hoc</i> Tukey $p < 0.05$

Para evidenciar si hay cambios estadísticamente significativos en la evaluación del porcentaje del cambio de peso de los animales y la neuropuntuación se utilizó la prueba de ANOVA de 2 vías (factores: tiempo-tratamiento) de medidas repetidas (ya que se evalúa los mismos animales por un curso temporal específico para cada prueba) con una prueba *post hoc* de Tukey con una $p < 0.05$.

Materiales y métodos

Para evidenciar si hay cambios estadísticamente significativos en los resultados obtenidos mediante el modelo de órgano aislado se utilizó una regresión no lineal de una curva logística de 4 parámetros (Cima, fondo, coeficiente de Hill y CE₅₀) utilizando la siguiente ecuación (Motulsky & Christopoulos, 2004):

$$y = fondo + \frac{Cima - fondo}{1 + \left(\frac{10^{LogCE_{50}}}{10^x}\right)^{Coeficiente\ de\ Hill}}$$

Donde:

Fondo, que es el nivel de respuesta, si lo hay, en ausencia de fármaco.

Cima (E_{max}), que es el nivel de respuesta máximo producido por una concentración alta de fármaco.

LogCE₅₀, medida de potencia de un fármaco, el logaritmo de la concentración del fármaco que produce el 50% de la respuesta máxima.

Coeficiente de Hill: denota la pendiente de la curva dosis-respuesta (sensibilidad del sistema a los incrementos en las concentraciones del fármaco).

Finalmente, para evidenciar si hay cambios estadísticamente significativos en la determinación de la frecuencia cardíaca, presión arterial y la expresión enzimática, se utiliza una prueba de ANOVA de 1 vía (factor: tratamiento) y para el estado de estrés oxidante, se utiliza una prueba de Kruskal-Wallis, ambas pruebas con una prueba *post hoc* de Tukey con una $p < 0.05$.

Resultados

6. Resultados

6.1. Severidad del TCE

Los resultados de la determinación de presión del golpe para el grupo TCE + PBS fue de 2.96 atm \pm 0.047 atm, mientras que el grupo de TCE + NaHS fue de 3.02 atm \pm 0.063 atm. Estos resultados coinciden con un impacto que induce un TCE de intensidad “severa”.

6.2. Efecto del TCE severo sobre la frecuencia cardiaca y la presión arterial

La evaluación del efecto que produce la inducción de un TCE severo se llevó a cabo en las siguientes variables después de 7 días: frecuencia cardiaca (FC), presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y la presión arterial media (PAM). Como se puede observar en la tabla 4, los animales pertenecientes al grupo Sham tuvieron valores dentro de un rango fisiológico (valores fisiológicos en ratas macho Wistar) (FC:<450, PAS: <145, PAD: <100 y PAM: <110). Por otro lado, los animales del grupo TCE + PBS presentaron un aumento significativo en todas las variables evaluadas al ser comparado con el grupo Sham (FC: 422.3 \pm 6.8 lpm, 28%, p=0.0008; PAS: 146.8 \pm 6.7 mm Hg, 26%, p=0.0018; PAD: 120.0 \pm 7.1 mm Hg, 36%, p=0.0051; PAM: 129.2 \pm 6.6 mm Hg, 31%, p=0.0023) De manera interesante, el grupo TCE + NaHS 3.1 mg/kg previno significativamente el aumento en todas las variables inducido por el TCE.

Tabla 4. Efecto de la administración subcrónica de NaHS en los valores de frecuencia cardiaca y presión arterial en animales inducidos a un TCE severo.

Grupos	FC (lpm)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
Sham	329 \pm 8.3	115.8 \pm 2.4	87.7 \pm 1.9	98.6 \pm 1.7
TCE + PBS	422.3 \pm 6.8 ***	146.8 \pm 6.7 **	120.0 \pm 7.1 **	129.2 \pm 6.6 **
TCE + NaHS	362.2 \pm 21.7 #	120.8 \pm 5.3 ##	96.5 \pm 7.6 #	104.7 \pm 6.6 #

Valores de las variables del tratamiento con NaHS (3.1 mg/kg) a animales que sufrieron un TCE, así como la administración de vehículo (PBS 1 mL/kg). Cada valor representa la media \pm EEM de 6 animales. ANOVA de 1 vía *post hoc* Tukey * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs Sham, # p<0.05, ## p<0.01 vs TCE+PBS.

Resultados

6.3. Efecto del NaHS sobre el peso corporal de los animales inducidos a un TCE severo

El efecto de los diversos tratamientos sobre el peso corporal de los animales se presenta en la figura 14. Los valores de peso total de cada grupo se presentan en la figura 14a y el porcentaje de cambio del peso con respecto al valor basal se presentan en la figura 14b.

El grupo Sham tuvo un valor de peso basal de 315.2 ± 10.6 g. Un día después de la craneotomía, los animales bajaron de peso a 300.6 ± 11.2 g, es decir, una reducción $4.7\% \pm 0.8\%$. Esta reducción fue recuperada entre el día 2 y el día 7 después de la cirugía, alcanzando un peso de 331.4 ± 9.6 g, es decir, un incremento en el porcentaje de cambio de $5.4\% \pm 1.6\%$ con respecto al valor basal. Un experimento preliminar utilizando un grupo naïve (animales sin craneotomía ni inducción de TCE) demostró que la pérdida de peso al día 1 postcirugía del grupo Sham no fue estadísticamente significativa. Por lo que el grupo Sham se utilizó como control para comparar el cambio de peso corporal con los animales de los demás grupos experimentales.

El grupo TCE + PBS tuvo un valor de peso basal de 289 ± 8.8 g. Un día después del TCE, el peso corporal se redujo a 257.8 ± 9.3 g, es decir, tuvo una reducción de $11.1 \pm 1.3\%$. Al día 2 postTCE, el peso corporal de los animales fue de 248.7 ± 12 g, es decir, tuvo una reducción de $14.4 \pm 2.0\%$ la cual fue estadísticamente significativa con respecto al grupo Sham ($p=0.003$). Posteriormente los animales comenzaron a ganar peso a partir del día 3 hasta el día 7 postTCE. Sin embargo, los animales no lograron recuperar el peso con el que iniciaron el protocolo (277 ± 14.2 g) finalizando con un porcentaje de cambio de $-4.6 \pm 3.5\%$ siendo estadísticamente significativo con respecto al grupo Sham ($p=0.006$).

Finalmente, los animales pertenecientes al grupo TCE + NaHS tuvieron un peso basal de 291.9 ± 4.3 g. A los días 1 y 2 postTCE, el peso de los animales disminuyó a 259.1 ± 6.6 g alcanzando una reducción de $9.63 \pm 1.11\%$ y 247.9 ± 8.3 g, alcanzando una reducción de $12.9 \pm 1.7\%$, respectivamente. Esta reducción no fue estadísticamente significativa con respecto a la reducción de peso observada en el grupo TCE+PBS. Entre los días 3 y 7 postTCE, el peso de los animales incrementó gradualmente, aunque no alcanzó el peso inicial, llegando al peso de 279.5 ± 14.5 g, con un porcentaje de cambio de $-3.8\% \pm 3.6\%$.

Resultados

Dicho cambio no fue estadísticamente significativo con el grupo TCE + PBS. Estos resultados sugieren que el tratamiento con NaHS en animales que fueron sometidos a un TCE no tuvo efecto en la pérdida de peso de los animales ocasionada por la inducción de un TCE severo.

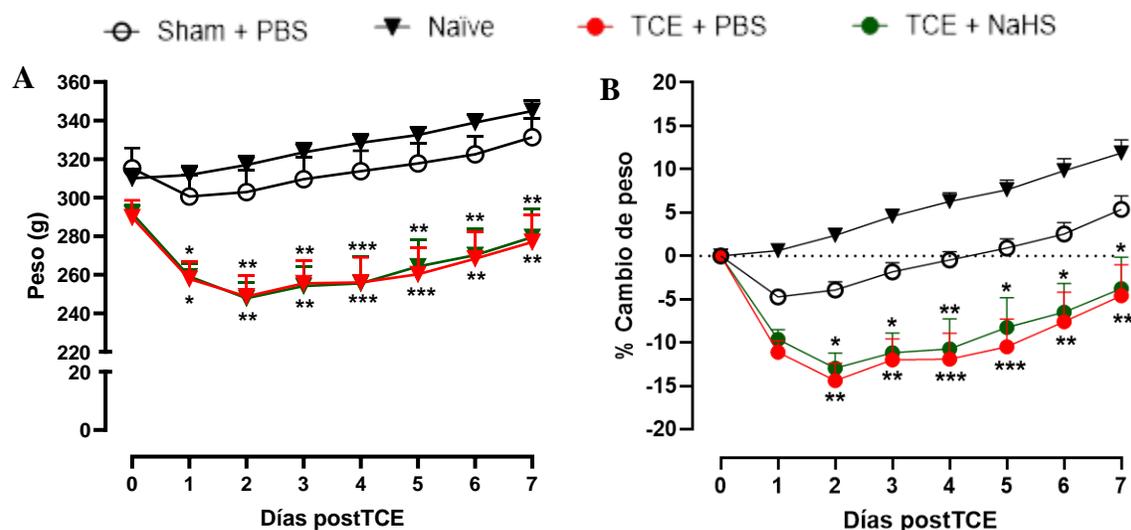


Figura 14. Efecto de la administración de NaHS sobre el peso corporal en animales sometidos a un TCE severo. A) Peso total de los animales y B) Porcentaje de cambio de peso con respecto al basal de cada grupo. En ambos casos se presentan animales del grupo Sham, del grupo Naïve, del grupo TCE + PBS y del grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). ANOVA 2 vías *post hoc* Tukey ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ vs Sham. Cada símbolo representa la media \pm EEM de 10 animales.

6.4. Efecto del NaHS sobre la función sensoriomotora de los animales inducidos a un TCE severo

En la Fig. 15 se presentan los neuropuntajes obtenidos antes del TCE (basal), 2 y 7 días después del TCE. El grupo Sham obtuvo un puntaje basal de 27.2 ± 0.22 , el cual se mantuvo en el día 2 postTCE con un puntaje de 26.43 ± 0.5 , y en día 7 postTCE, con un puntaje de 26.9 ± 0.1 . En el caso del grupo TCE+ PBS los animales obtuvieron un puntaje basal de 27.1 ± 0.2 ; al día 2 postTCE el puntaje disminuyó hasta 16.46 ± 1.4 , presentando una diferencia significativa con el grupo Sham ($p < 0.001$). Ese puntaje se mantuvo hasta el día 7 postTCE donde los animales obtuvieron un puntaje de 17.25 ± 0.8 , estos valores fueron estadísticamente significativos con respecto a los del grupo Sham ($p < 0.001$). Con respecto al grupo TCE + NaHS, el puntaje basal fue de 26.9 ± 0.19 ; posteriormente, al día 2 postTCE, dicho puntaje disminuyó a 14.61 ± 1.25 sin presentar diferencia significativa con el grupo

Resultados

TCE+PBS. De manera sorprendente, al día 7 postTCE, el grupo TCE+NaHS aumentó su puntaje a 20.16 ± 1.48 . Dicho incremento fue estadísticamente significativo con respecto al día 2 del mismo grupo TCE+NaHS ($p=0.014$). Por lo anterior se concluye que el tratamiento con NaHS provocó un discreto aumento en el neuropuntaje al día 7 postTCE.

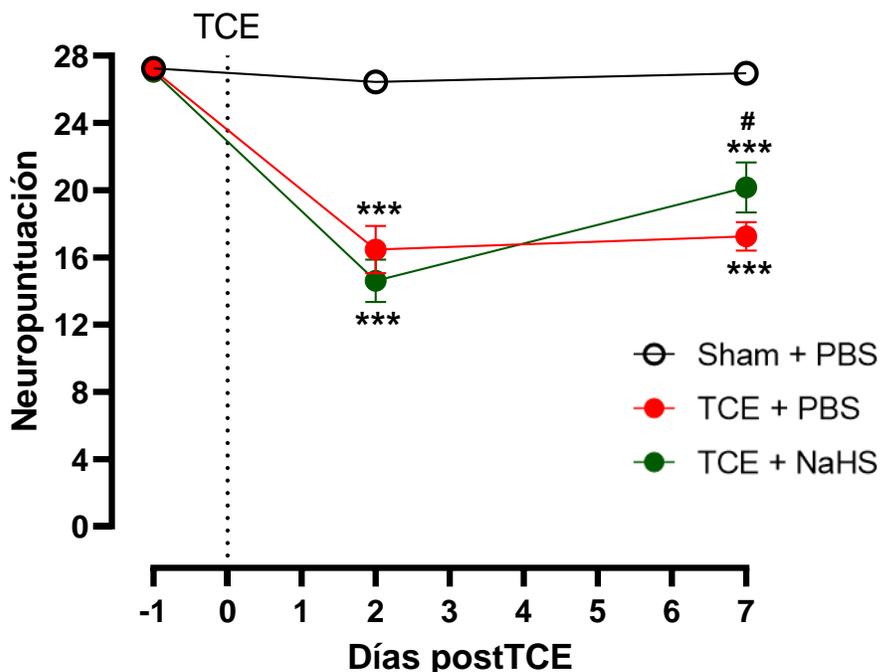


Figura 15. Efecto de la administración de NaHS sobre la disfunción sensoriomotora en animales sometidos a un TCE severo. Se evaluó el neuropuntaje de los animales pertenecientes al grupo Sham, del grupo TCE + PBS y del grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). ANOVA de 2 vías *post hoc* Tukey *** $p < 0.001$ vs Sham. ANOVA de 2 vías de medidas repetidas # $p < 0.05$ vs TCE + NaHS al día 2 post-TCE. Cada símbolo representa la media \pm EEM de 10 animales.

6.5. Efecto del NaHS sobre la vasorrelajación dependiente de carbacol y de la vasoconstricción dependiente de noradrenalina de los animales inducidos a un TCE severo.

En la Fig. 16 se presentan los resultados obtenidos de las curvas de relajación de carbacol en aortas torácicas de los grupos experimentales. Todas las aortas fueron contraídas previamente con noradrenalina y, a partir de su contracción máxima, se calculó la relajación provocada por el carbacol. Las aortas torácicas del grupo Sham presentaron un efecto de vasorrelajación dependiente de la concentración de carbacol con un efecto máximo de $97.8\% \pm 6.6\%$. El grupo TCE+PBS también presentó un efecto de vasorrelajación dependiente de la concentración de carbacol. Sin embargo, el efecto máximo que presentó dicho grupo fue de

Resultados

59.5% \pm 3.4% siendo estadísticamente diferente con respecto al grupo Sham ($p=0.039$). El grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg) presentó un efecto de vasorrelajación dependiente de la concentración de carbacol similar al grupo Sham y presentó un efecto máximo de 81.3% \pm 6.0%, valor que fue estadísticamente significativo con respecto al grupo TCE+PBS ($p=0.036$).

Por otra parte, la potencia (pCE_{50}) del carbacol fue determinado para cada grupo experimental (Tabla 5). La pCE_{50} para el grupo Sham fue de 6.40 ± 0.11 , lo que significa que se necesitó una concentración de 3.93×10^{-7} M de carbacol para conseguir el 50% del efecto máximo. La pCE_{50} para el grupo TCE+PBS fue de 5.91 ± 0.07 , lo que significa que se necesitó una concentración de 1.20×10^{-6} M de carbacol para producir el 50% del E_{max} . Esta concentración fue significativamente mayor que la CE_{50} del grupo Sham ($p=0.003$). Finalmente, la pCE_{50} para el grupo TCE+NaHS fue similar al grupo Sham, siendo de 6.53 ± 0.13 , lo que equivale a una concentración de 2.91×10^{-7} M de carbacol. Dicho valor fue significativamente menor que la concentración necesaria para el grupo TCE+PBS ($p=0.006$). Este dato indica que el tratamiento con NaHS evita las alteraciones provocadas por la inducción del TCE en las respuestas vasorrelajantes al carbacol.

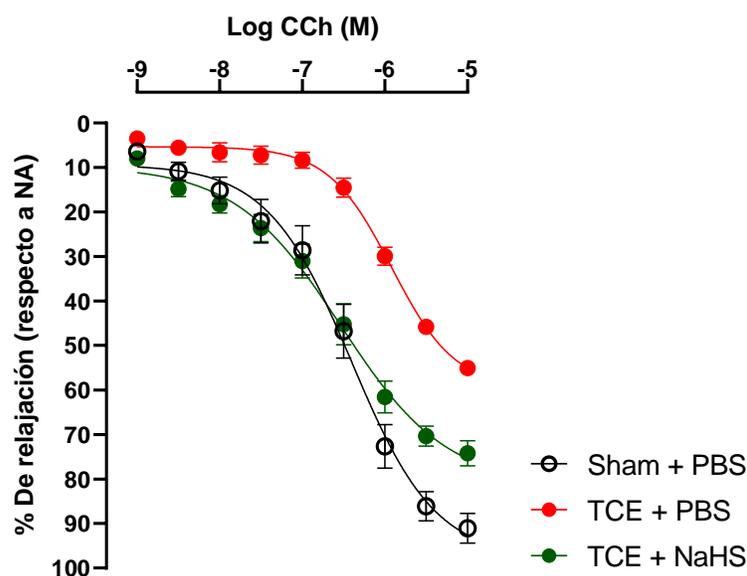


Figura 16. Efecto de la administración de NaHS en las respuestas vasorrelajantes inducidas por carbacol en aortas torácicas postTCE. Las aortas torácicas fueron obtenidas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). Cada símbolo representa la media \pm EEM de 6 animales.

Resultados

En la Fig. 17 se presentan los resultados obtenidos de las curvas de contracción de noradrenalina en aortas torácicas de los grupos experimentales. En el grupo Sham, la noradrenalina produjo un efecto de vasoconstricción dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de 1.46 ± 0.06 g. Además, en el grupo TCE + PBS, la noradrenalina produjo un efecto de vasoconstricción dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de 2.16 ± 0.09 g. Dicho efecto máximo fue significativamente mayor que el observado en el grupo Sham ($p=0.001$). En el grupo de TCE +NaHS, al igual que los otros dos grupos experimentales, la noradrenalina produjo una vasoconstricción dependiente de la concentración. De manera interesante, dicho efecto fue similar a la del grupo Sham, alcanzando un efecto máximo de 1.64 ± 0.06 g. Este valor fue significativamente menor que el grupo TCE+PBS ($p=0.009$), sugiriendo que el tratamiento con NaHS revirtió el aumento del efecto contráctil de la noradrenalina posterior a la inducción de un TCE.

Por otra parte, también se obtuvieron los valores de pCE_{50} de cada grupo experimental (tabla 5). En el caso del grupo Sham, la pCE_{50} fue de 6.94 ± 0.09 , lo que significa que se necesitó una concentración de 1.12×10^{-7} M de noradrenalina para alcanzar el 50% del efecto máximo. Además, en el grupo de TCE + PBS se obtuvo una pCE_{50} de 7.31 ± 0.09 , lo que representó una concentración de 4.84×10^{-8} M para lograr dicho efecto. Este dato sugirió una menor concentración necesaria para alcanzar el 50% del efecto máximo. Este valor fue significativamente diferente al obtenido en el grupo Sham ($p=0.012$). De manera sorprendente, en el grupo TCE+ NaHS, la pCE_{50} fue de 6.70 ± 0.06 , lo que significó una concentración de 1.97×10^{-7} M de noradrenalina, es decir, una concentración mayor de noradrenalina para inducir el 50% del efecto máximo. Este valor fue estadísticamente significativo al obtenido en el grupo TCE+PBS ($p<0.001$) y al valor obtenido en el grupo Sham ($p=0.044$). Estos resultados indica que el tratamiento con NaHS revierte los cambios contráctiles inducidos por la noradrenalina en los animales que fueron sometidos a un TCE.

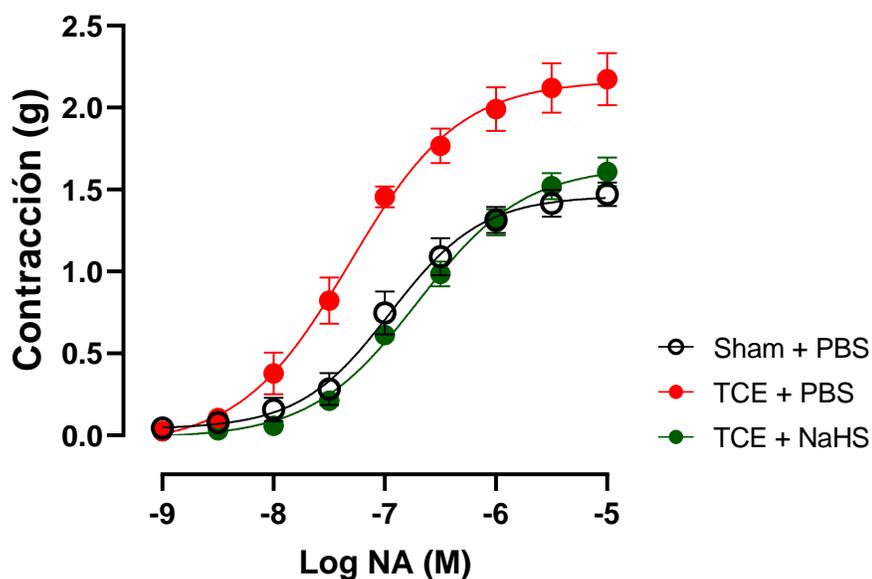


Figura 17. Efecto de la administración de NaHS en las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina en aortas torácicas postTCE. Las aortas torácicas fueron obtenidas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). Cada símbolo representa la media \pm EEM de 6 animales

Tabla 5. Efecto máximo y potencia del carbacol y noradrenalina en aortas torácicas provenientes de los diferentes grupos experimentales.

Grupos	Carbacol		Noradrenalina	
	pCE ₅₀	E _{max} (%)	pCE ₅₀	E _{max} (g)
Sham + PBS	6.4 \pm 0.1	97.8 \pm 6.6	6.9 \pm 0.09	1.5 \pm 0.06
TCE + PBS	5.9 \pm 0.07*	59.5 \pm 3.3*	7.3 \pm 0.09*	2.2 \pm 0.09*
TCE + NaHS	6.5 \pm 0.1&	81.3 \pm 6.0&	6.7 \pm 0.06*&	1.6 \pm 0.06&

Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pCE₅₀) y el efecto máximo (E_{max}) del carbacol y noradrenalina en aortas torácicas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). Cada valor representa la media \pm EEM de 6 animales. * p<0.05 vs Sham, & p<0.05 vs TCE+PBS.

6.6. Efecto per se del NaHS en la vasorrelajación dependiente de endotelio en aortas torácicas de animales inducidos a un TCE severo

En la Fig. 18 se presentan los resultados obtenidos de las curvas de relajación inducida por el NaHS, donador de H₂S en aortas torácicas de los grupos experimentales. Cabe mencionar que, los animales Sham y los animales que fueron sometidos a un protocolo de TCE severo solo fueron manipulados, es decir, no se administró el vehículo ni el NaHS. Esto con el

Resultados

propósito de observar el efecto *per se* del NaHS. En el grupo Sham, el NaHS produjo un efecto de vasorrelajación dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de 60.5 ± 12.8 %. Además, en el grupo TCE, el NaHS produjo un efecto de vasorrelajación dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de 34.7 ± 3.5 %. Dicho efecto máximo fue significativamente menor que el observado en el grupo Sham ($p=0.037$).

Por otra parte, también se obtuvieron los valores de pCE_{50} de cada grupo experimental (Tabla 6). En el caso del grupo Sham, la pCE_{50} fue de 2.6 ± 0.2 , lo que significa que se necesitó una concentración de 2.34×10^{-3} M de NaHS para alcanzar el 50% del efecto máximo. Además, en el grupo de TCE se obtuvo una pCE_{50} de 2.9 ± 0.1 , lo que representó una concentración de 1.31×10^{-3} M para lograr dicho efecto. Estos datos no fueron diferentes significativamente ($p=0.10$) por lo que la concentración para ejercer el 50% del efecto en ambos grupos es igual. Estos resultados sugirieron que el TCE modificó los blancos del H_2S provocando que el NaHS induzca un menor efecto máximo en la vasorrelajación en estos animales, pero con una potencia similar en comparación al grupo Sham.

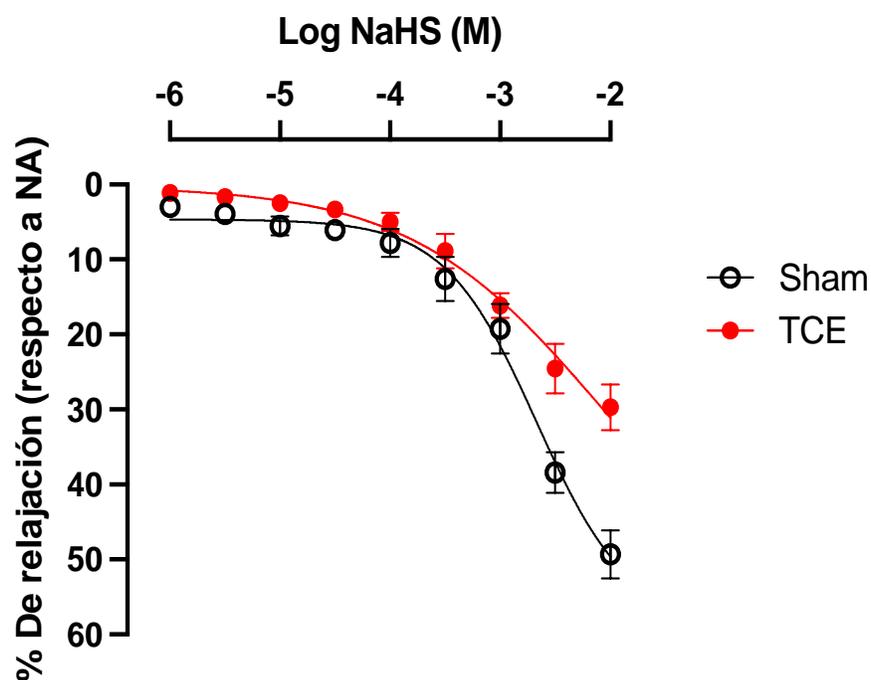


Figura 18. Efecto del TCE en las respuestas vasorrelajantes inducidas por NaHS en aortas torácicas. Las aortas torácicas fueron obtenidas de animales pertenecientes al grupo Sham y al grupo TCE. Cada símbolo representa la media \pm EEM de 6 animales.

Resultados

Tabla 6. Efecto máximo y potencia del NaHS en aortas torácicas provenientes de los diferentes grupos experimentales.

NaHS		
Grupos	pCE ₅₀	E _{max} (%)
Sham	2.63 ± 0.24	60.51 ± 12.79
TCE	2.88 ± 0.13	34.72 ± 3.46*

Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pCE₅₀) y el efecto máximo (E_{max}) del NaHS en aortas torácicas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). . Cada valor representa la media ± EEM de 6 animales. * p<0.05 vs Sham.

6.7. Efecto del nitroprusiato de sodio en la vasorrelajación dependiente de endotelio en aortas torácicas de animales inducidos a un TCE severo

En la Fig. 19 se presentan los resultados obtenidos de las curvas de contracción de nitroprusiato de sodio en aortas torácicas de los grupos experimentales. En el grupo Sham, el nitroprusiato de sodio produjo un efecto de vasorrelajación dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de $108.7 \pm 2.4\%$. Además, en el grupo TCE + PBS, el nitroprusiato de sodio produjo un efecto de vasorrelajación dependiente de la concentración, alcanzando un efecto máximo de $106.2 \pm 3.2\%$. Dicho efecto máximo no fue estadísticamente diferente al observado en el grupo Sham. En el grupo de TCE + NaHS, al igual que los otros dos grupos experimentales, el nitroprusiato de sodio produjo una vasorrelajación dependiente de la concentración. De manera interesante, dicho efecto fue similar a los dos grupos experimentales anteriores, alcanzando un efecto máximo de $107.7 \pm 3.6\%$. Este valor fue estadísticamente igual al de los otros grupos experimentales.

Por otra parte, también se obtuvieron los valores de pCE₅₀ de cada grupo experimental (tabla 7). En el caso del grupo Sham, la pCE₅₀ fue de 7.7 ± 0.07 , lo que significa que se necesitó una concentración de 2.18×10^{-8} M de nitroprusiato de sodio para alcanzar el 50% del efecto máximo. Además, en el grupo de TCE + PBS se obtuvo una pCE₅₀ de 7.6 ± 0.09 , lo que representó una concentración de 2.39×10^{-8} M para lograr dicho efecto. Este dato sugirió que para ambos grupos se necesita una concentración similar para alcanzar el 50% del efecto máximo. Por otro lado, el grupo TCE+ NaHS, la pCE₅₀ fue de 7.6 ± 0.1 , lo que significó una

Resultados

concentración de 2.69×10^{-8} M de nitroprusiato de sodio, es decir, una concentración similar de nitroprusiato de sodio al de los otros grupos experimentales para inducir el 50% del efecto máximo. Estos resultados indica que el TCE no modifica la vía de señalización del NO, ya que el nitroprusiato de sodio es un donador de NO lo que nos permite observar cambios en la vía de señalización del MLV.

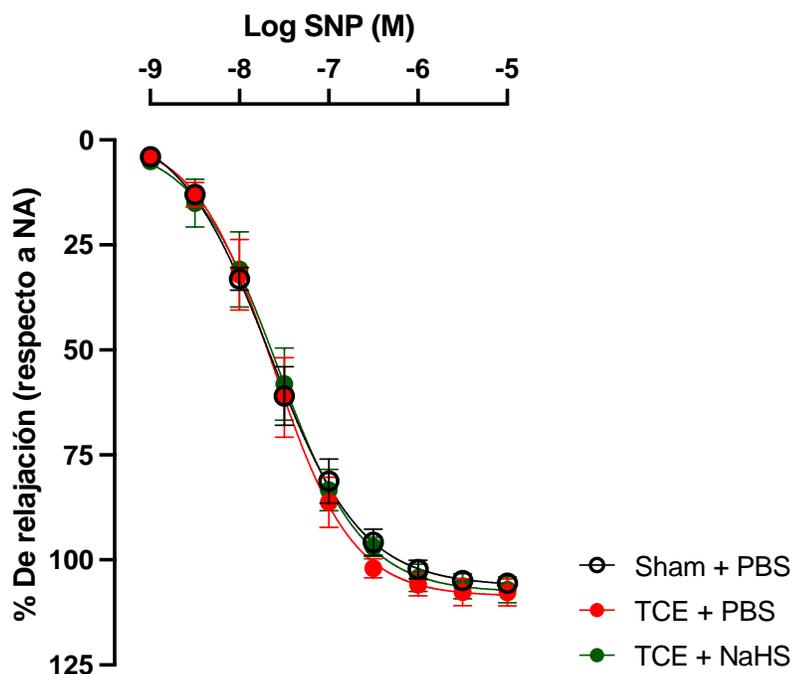


Figura 19. Efecto de la administración de NaHS en las respuestas vasorrelajantes inducidas por nitroprusiato de sodio en aortas torácicas postTCE. Las aortas torácicas fueron obtenidas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). Cada símbolo representa la media \pm EEM de 6 animales.

Tabla 7. Efecto máximo y potencia del nitroprusiato de sodio en aortas torácicas provenientes de los diferentes grupos experimentales

Grupos	Nitroprusiato de sodio	
	pCE ₅₀	E _{max} (%)
Sham + PBS	7.66 \pm 0.07	108.7 \pm 2.44
TCE + PBS	7.62 \pm 0.09	106.2 \pm 3.21
TCE + NaHS	7.57 \pm 0.10	107.7 \pm 3.55

Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pCE₅₀) y su efecto máximo (E_{max}) del nitroprusiato de sodio en aortas torácicas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). Cada valor representa la media \pm EEM de 6 animales.

Resultados

6.8. Efecto del NaHS en los niveles de ROS en aortas torácicas de animales inducidos a un TCE severo.

En la figura 20 se muestra los resultados de la determinación de estrés oxidante mediante el método de DCFH-DA. Así, aortas torácicas provenientes de animales sometidos a un TCE severo presentaron un mayor número de unidades relativas de fluorescencia (URF) estadísticamente significativo en comparación al grupo Sham ($p=0.03$). De manera interesante, en el grupo TCE + NaHS se redujo el número de unidades relativas de fluorescencia (URF) siendo significativamente menor en comparación al grupo que fue sometido a un TCE severo ($p=0.03$) sin ser diferente al grupo Sham ($p=0.99$). Estos resultados indicaron que después de un TCE existe un aumento de ROS conllevando a un aumento del estrés oxidante mientras que el tratamiento con NaHS (3.1 mg/kg) previno dicho aumento manteniéndolo en condiciones parecidas al grupo Sham.

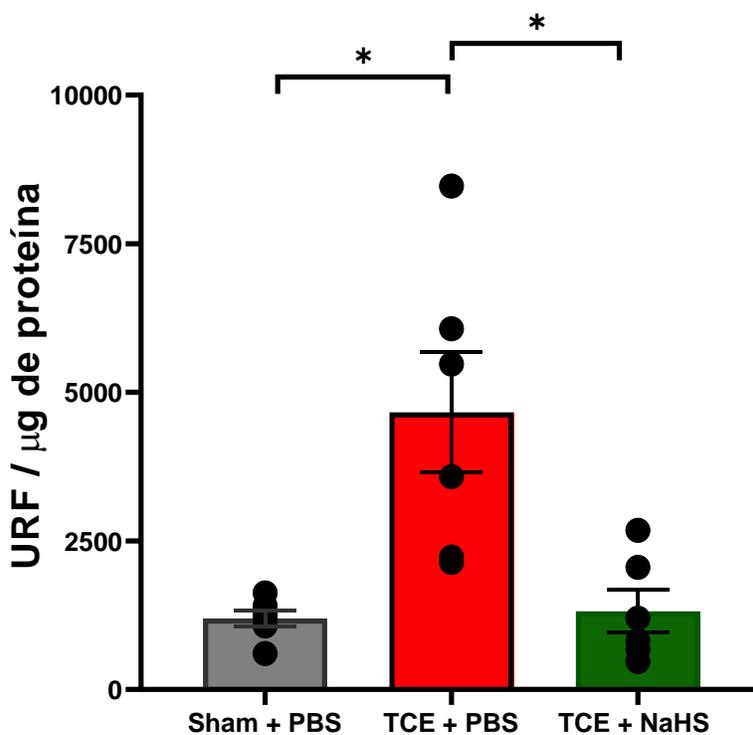


Figura 20. Efecto de la administración de NaHS en los niveles de ROS en aortas torácicas postTCE. Las aortas torácicas fueron obtenidas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. Prueba de Kruskal-Wallis *post hoc* Tukey * $p<0.05$

Resultados

6.9. Efecto del NaHS en la expresión de las enzimas que sintetizan H₂S y de la eNOS y p-eNOS en aortas torácicas de animales sometidos a un TCE severo.

En la figura 21 se muestra la expresión relativa (al día 7 postTCE) de las enzimas productoras de H₂S: 3-MST (Fig. 11A), CSE (Fig. 11B) y CBS (Fig. 11C) en las aortas torácicas del grupo Sham, grupo TCE + PBS y TCE + NaHS. Se observa que en el grupo de TCE + PBS, las enzimas productoras de H₂S se encuentran disminuidas al día 7 postTCE, mostrando una diferencia estadísticamente significativa la expresión de la enzima 3-MST ($p=0.014$) y la CSE ($p=0.002$). Con respecto a la CBS, a pesar de no ser estadísticamente diferente, se observa una clara disminución de su expresión ($p=0.15$). Por otra parte, en los animales del grupo TCE + NaHS, la administración del fármaco restauró los niveles de expresión de las 3 enzimas productoras de H₂S siendo estadísticamente significativos en comparación al grupo TCE + PBS (CBS [$p=0.002$], CSE [$p=0.0008$] y 3-MST [$p=0.0004$]). En el caso particular de la CBS, el NaHS provocó un aumento de su expresión siendo también estadísticamente significativo con respecto al grupo Sham ($p=0.045$).

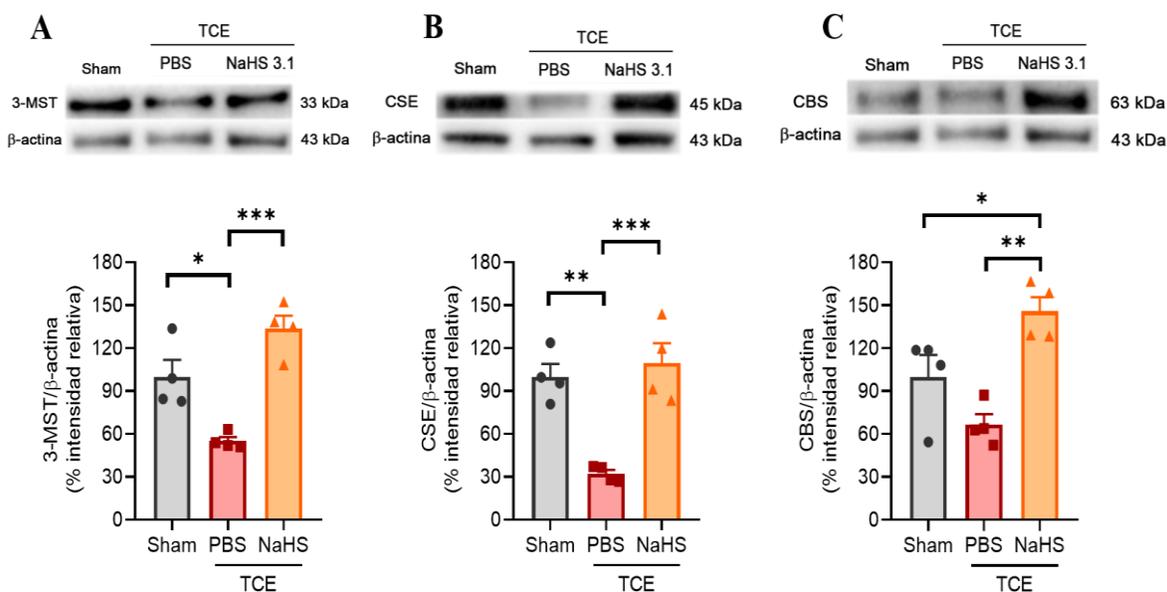


Figura 21. Expresión de las enzimas que sintetizan H₂S en aortas torácicas postTCE. Se muestra la imagen representativa de la expresión de las enzimas 3-MST (a), CSE (b) y CBS (c) en aortas torácicas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). Cada barra representa la media \pm EEM de 4 animales. ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Tukey. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

En la figura 22 se muestra la imagen representativa (22a) expresión relativa (al día 7 postTCE) de la enzima eNOS (22b), su forma fosforilada (p-eNOS) (22c) y la relación entre

Resultados

ambas (p-eNOS/eNOS) (22d) en las aortas torácicas del grupo Sham, del grupo TCE + PBS y del grupo TCE + NaHS. En el grupo TCE + PBS, la expresión de las enzima eNOS, p-eNOS y la relación p-eNOS/eNOS se encuentran disminuidas al día 7 postTCE, mostrando una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de la p-eNOS ($p=0.005$) y la relación de p-eNOS/eNOS ($p=0.002$). Con respecto a la eNOS total, a pesar de no ser estadísticamente diferente, se observa una clara disminución de su expresión ($p=0.053$). Por otra parte, los animales del grupo TCE + NaHS restauró la expresión de la eNOS, y aumentó los niveles de p-eNOS y de la relación p-eNOS/eNOS siendo estadísticamente significativos en comparación al grupo sometido a un TCE severo (eNOS total [$p=0.041$], p-eNOS [$p=0.0012$] y p-eNOS/eNOS [$p=0.054$]).

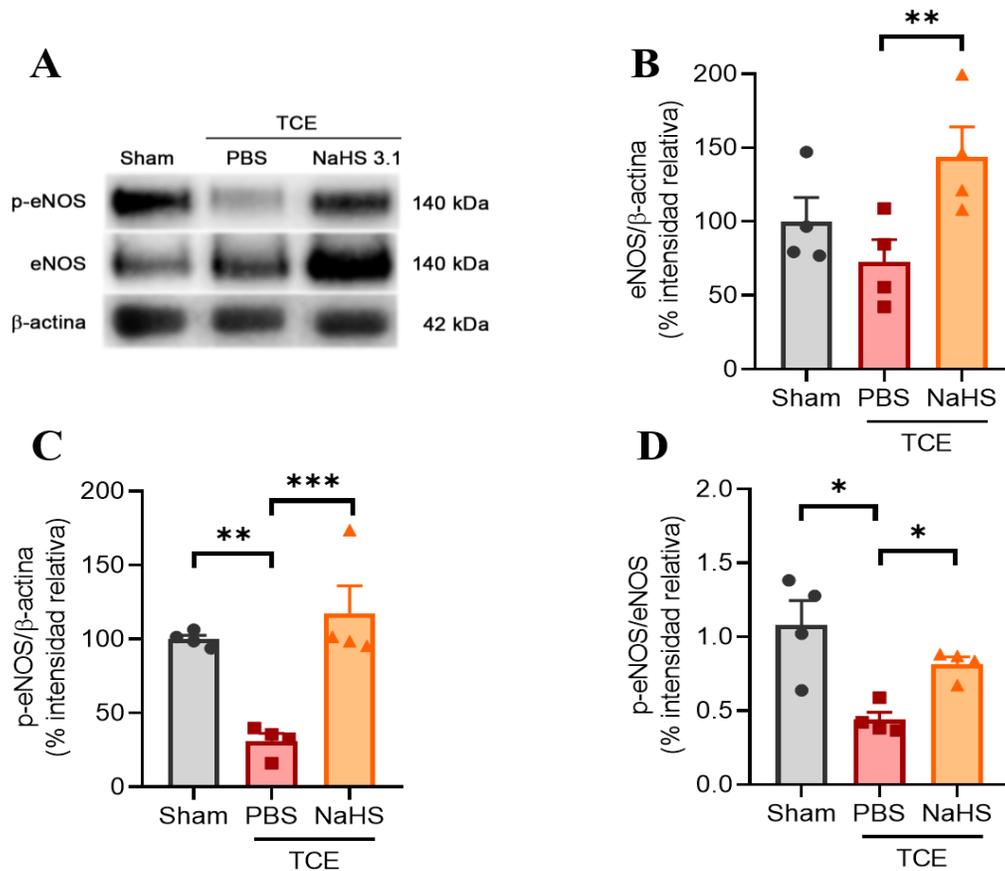


Figura 22. Efecto de la administración de NaHS en la expresión de la eNOS y p-eNOS en aortas torácicas postTCE. Imagen representativa (a) de la expresión de las enzimas eNOS (b) y p-eNOS (c) y la relación de eNOS y p-eNOS (d) en aortas torácicas de animales pertenecientes al grupo Sham, al grupo TCE + PBS y al grupo TCE + NaHS (3.1 mg/kg). Cada barra representa la media \pm EEM de 4 animales. ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Tukey. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

7. Discusión

Al día 7 después de la inducción de un TCE severo se observó: 1) un aumento en las frecuencia cardíaca y la presión arterial; 2) una disminución en la potencia y efecto máximo de las respuestas relajantes inducida por carbacol; 3) un incremento en la potencia y efecto máximo de la vasoconstricción inducida por noradrenalina; 4) una disminución en la expresión y fosforilación (Ser¹¹⁷⁷) de la eNOS en la aorta torácica; 5) un aumento de la producción de ROS ; y 6) una disminución de las respuestas vasculares inducidas por NaHS. Por otro lado, la inducción de un TCE severo no modificó las respuestas vasorrelajantes de un donador exógeno de NO. De forma similar, se observó un déficit en la función sensoriomotora y en la ganancia de peso corporal postTCE, tal como se reportó previamente (Santiago-Castañeda et al., 2020; Segovia-Oropeza et al., 2020).

La administración subcrónica de NaHS evitó: 1) las alteraciones en la frecuencia cardíaca y la presión arterial; 2) la disminución en la potencia y efecto máximo de las respuestas relajantes inducidas por carbacol; 3) el incremento en la potencia y efecto máximo de las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina; 4) la disminución en la expresión de las enzimas productoras de H₂S, asimismo de la expresión y fosforilación de la eNOS; y 5) el aumento de las ROS. No obstante, la administración subcrónica de NaHS no previno la disfunción sensoriomotora o la alteración en la ganancia de peso corporal de los animales. Finalmente, nuestros resultados demuestran que la expresión de las enzimas productoras de H₂S disminuye en la aorta después de la inducción de un TCE severo.

7.1. Disfunción sensoriomotora y cambio en el peso corporal inducidos por un TCE severo

El modelo de LLPF es un modelo preclínico de TCE que puede reproducir algunos aspectos observados en humanos como son el edema, la alteración de la barrera hematoencefálica y las hemorragias de tipo subdural e intraventricular (Frey et al., 2008). Estas condiciones pueden desencadenar alteraciones en las respuestas biomecánicas, fisiológicas, neurológicas y morfológicas (McIntosh et al., 1989; Frey et al., 2008). De hecho, se ha reportado que el TCE induce alteraciones en la función sensoriomotora de los animales a corto (Sackheim et al., 2017; Bhowmich et al., 2018) y largo plazo (Pierce et al., 1998; Bhowmich et al., 2018;

Sell et al., 2017). En este sentido, nuestros resultados muestran que después de la inducción de un TCE severo se presenta una disfunción sensoriomotora que coincide con lo previamente reportado por nuestro grupo de investigación (figura 15) (Santiago-Castañeda et al., 2020; Segovia-Oropeza et al., 2020; Huerta de la Cruz et al., 2022). Además, se ha reportado una recuperación parcial de la función sensoriomotora después de cuatro semanas postTCE (McIntosh et al., 1987, 1989). Sin embargo, dado que el tiempo de evaluación más largo empleado en el presente trabajo fueron 7 días postTCE, no fue posible observar dicha recuperación en nuestras condiciones experimentales.

El control de la función sensoriomotora se lleva a cabo mediante una red compleja de interacciones entre diferentes áreas cerebrales, médula espinal y los nervios periféricos. Las áreas cerebrales implicadas en el control de la función sensoriomotora (figura 23) son la corteza somatosensorial, la corteza motora, los ganglios basales, el tálamo, el tallo cerebral y el cerebelo (Mosconi et al., 2017; Bostan & Strick, 2018). Se ha reportado que después de un TCE se presenta una atrofia cerebral progresiva que daña la integración de la información que fluye en las vías somatosensoriales ascendentes y las vías motoras descendientes, lo que desencadena una disfunción cognitiva, emocional y sensoriomotora (Bhrowmich et al., 2018; Johnstone et al., 2015; Yang et al., 2017).

Por otra parte, el hipotálamo es una estructura compleja encargada del control del hambre a través del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), mismo que permite dirigir el comportamiento de alimentación de acuerdo con señales fisiológicas, cognitivas y ambientales (Ferguson et al., 2008). Nuestros resultados muestran que, después de la inducción de un TCE severo, los animales presentan una pérdida de peso que no se evita aún con el consumo de alimento (figura 14). Acorde con lo anterior, se ha reportado que el aumento en la ingesta de alimento no implica una ganancia mayor de peso corporal (Roe & Rotchwell, 1997). Por lo que, además de encontrarse un daño en el hipotálamo, podrían estar involucrados otros componentes que afectan la homeostasis energética como el hipermetabolismo (Foley et al., 2008) o la disfunción en el sistema nervioso entérico (figura 23) (Hanscom et al., 2021).

Discusión

El hipermetabolismo se caracteriza por un aumento en la tasa metabólica basal del cuerpo asociado a un catabolismo proteico elevado que puede contribuir a la pérdida de peso (Dev et al., 2015). Existen reportes en la clínica que indican que después de un TCE severo se presentan tormentas simpáticas paroxísticas (Heffernan et al., 2010; Tang et al., 2017; Sakai et al., 2022). Estas tormentas simpáticas aumentan el catabolismo, lo que se traduce en un estado hipermetabólico. Este estado provoca una resistencia al soporte nutricional y como consecuencia la pérdida de peso (Heffernan et al., 2010). Asimismo, después de un TCE, el sistema nervioso entérico se modifica a diferentes niveles siendo la disfunción autonómica el principal factor que modifica la liberación de enzimas digestivas, la restricción de la contractilidad y la inflamación intestinales (Kharrazian, 2015; Hanscom et al., 2021).

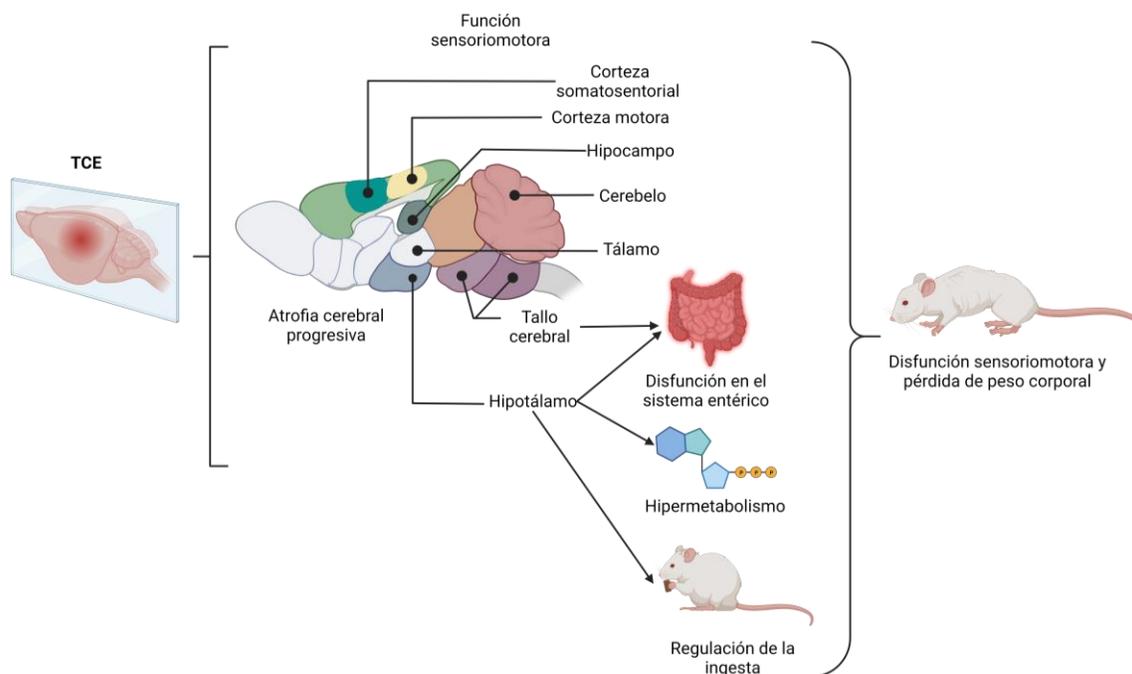


Figura 23. Mecanismos que conllevan a la disfunción sensoriomotora y pérdida de peso corporal postTCE. Cuando ocurre un TCE existe una atrofia cerebral progresiva que daña estructuras cerebrales relacionadas con la función sensoriomotora y la ingesta de alimento.

7.2. El TCE severo induce cambios en la frecuencia cardiaca y la presión arterial

En ensayos clínicos y preclínicos, se ha reportado que, existe un incremento de la presión arterial y la frecuencia cardiaca después de un TCE (Krishnamoorthy et al., 2017; Bharath et al., 2020; Rzhetskaya, 2012; Hilz et al., 2017; Larson et al., 2012; Sillesen et al., 2014).

Discusión

Nuestros resultados mostraron un aumento significativo en las variables determinadas como son la frecuencia cardíaca, presión arterial sistólica, diastólica y media (tabla 3).

A nivel preclínico, los cambios en la frecuencia cardíaca y presión arterial postTCE son dinámicos. Es decir, en las primeras 4 horas postTCE existe una marcada hipotensión y una disminución de la frecuencia cardíaca (Gabrielian et al., 2011; Lee et al., 2020); esta hipotensión evoluciona a una hipertensión sostenida y un aumento de la frecuencia cardíaca en los animales después de 24 horas (Najafipour et al., 2014) y que se mantiene hasta el día 28 postTCE (Huerta de la Cruz et al., 2022). Sin embargo, no existen reportes a nivel preclínico que evalúen dichas variables diariamente después de la inducción del TCE.

Se ha sugerido que el incremento en las frecuencia cardíaca y la presión arterial después del TCE puede explicarse por la aparición de disfunción autonómica. La disfunción autonómica se caracteriza por un desbalance entre el sistema simpático y el sistema parasimpático del sistema nervioso autónomo (Baguley et al., 2008). Lo anterior se presenta como una hiperactividad simpática y la disminución de la actividad parasimpática (Khalid et al., 2019). La disfunción autonómica tiene distintos mecanismos, incluido el daño a estructuras cerebrales como el hipotálamo (Ferguson et al, 2008) y el tallo cerebral (Chen et al., 2019b). En este sentido, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal puede sobre-activarse después del TCE causando una elevación de los niveles plasmáticos de diferentes hormonas como la corticosterona (Rowe et al., 2016) y la sobre-liberación de catecolaminas (Jenkins et al., 2016). Aunado a lo anterior, después del TCE existe una liberación excesiva de mediadores inflamatorios hacia la periferia que contribuye tanto a la disfunción autonómica como a la disfunción vascular (Schwulst et al., 2013; Bao et al., 2021). A pesar de que la disfunción vascular puede desencadenar un aumento de la presión arterial sistémica, existen pocos estudios que evalúan los cambios en la reactividad vascular después de un TCE.

7.3. El TCE severo induce cambios en los mecanismos locales de control de la función vascular

El óxido nítrico es el factor relajante derivado del endotelio por excelencia (Bolotina et al., 1994). Su efecto vasorrelajante depende de dos componentes: 1) la síntesis de la molécula,

Discusión

la cual se lleva a cabo en el endotelio vascular y 2) la vía de señalización del NO en la célula del músculo liso vascular. Nuestros resultados demuestran que existe una disminución de las respuestas vasorrelajantes derivadas del endotelio en las aortas obtenidas de animales sometidos a un TCE severo (figura 16). Dado que dicha disminución pudiera estar mediada por fallas en la síntesis de NO o en la señalización del NO en el MLV, decidimos evaluar las respuestas de relajación inducidas por un donador exógeno de NO, el nitroprusiato de sodio. Este compuesto es una sal soluble en agua que reacciona con los grupos tioles de los eritrocitos y de algunas proteínas como la albúmina para generar óxido nítrico (Hottinger et al., 2014) Una vez generado, el NO activa a la guanilato ciclasa en el músculo liso para producir un incremento de cGMP. Nuestros datos muestran que la vasorrelajación inducida por el nitroprusiato de sodio en el grupo TCE no fue significativamente diferente al grupo Sham (figura 19). Lo anterior permite sugerir que la disminución en las respuestas vasorelajantes derivadas del endotelio en arterias aortas está mediada por una alteración en la síntesis del NO en el endotelio vascular y no en la vía de señalización del óxido nítrico en el MLV, tal y como se ha reportado previamente (Villalba et al., 2017).

Se ha sugerido que la disfunción endotelial postTCE está mediada por un aumento en las ROS y el estrés oxidante (Villalba et al., 2017). Por lo tanto, fue de nuestro interés medir esos parámetros. En este sentido, el grupo que fue sometido a un TCE severo presentó un aumento de las ROS en las aortas en comparación con el grupo Sham (figura 20). Dicho aumento del estrés oxidante puede generar el desacople de la eNOS a través de la oxidación de la BH₄ a BH₂ que promueve la formación del radical superóxido (O₂•) y contribuye a la disfunción endotelial (Villalba et al., 2017) (Karbach et al., 2014).

En conjunto, la evidencia anteriormente descrita sugiere que la producción de NO está disminuida después del TCE. Por lo tanto, decidimos evaluar la expresión proteínica de la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial, así como su nivel de fosforilación. Nuestros resultados demuestran que existe una disminución de la expresión de la eNOS en el tejido aórtico de animales sometidos a un TCE severo (figura 22). Hasta donde sabemos, esta es la primera evidencia que reporta la expresión de la enzima eNOS en un vaso sanguíneo sistémico después de un TCE severo. Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con lo

Discusión

observado en arterias cerebrales, en donde no se observa un cambio en la expresión del RNAm de la eNOS (Villalba et al., 2014). Esto podría deberse al tiempo de evaluación (24 hrs vs 7 días postTCE) donde los cambios observados pueden ser dependientes del tiempo postTCE. Asimismo, en nuestro estudio se evaluó únicamente la expresión enzimática, por lo que sería interesante evaluar la expresión del RNAm en nuestro modelo, ya que existen diversos cambios transcripcionales afectando la expresión proteínica (Perl et al., 2017).

Se ha descrito que la fosforilación en el residuo de Ser¹¹⁷⁷ puede aumentar la actividad de la eNOS y, por tanto, la producción de NO y la vasorrelajación dependiente de endotelio. Nuestros resultados muestran una disminución en la fosforilación de la enzima eNOS en el residuo Ser¹¹⁷⁷. Es importante tener en cuenta que la fosforilación de la eNOS en el residuo de Ser¹¹⁷⁷ está regulada por la proteína Akt que, a su vez, está regulada por la PI3K (Dimmeler et al., 1999). La enzima PI3K convierte el PIP2 a PIP3 (Toker & Dibble, 2018). La acumulación de PIP3 recluta diversas proteínas efectoras, incluida la Akt para ser activada (Hemmings & Restuccia, 2012). La inflamación inducida por el TCE aumenta la actividad de la PLA2 y disminuye los niveles de PIP2, lo que trae como consecuencia la inhibición de la vía de señalización de Akt (Sackheim et al., 2021).

Por otra parte, se han reportado cambios en la funcionalidad de los receptores adrenérgicos en animales sometidos a un TCE severo (Huerta de la Cruz, et al. 2022a), por lo que se evaluaron las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina en anillos aórticos postTCE. De acuerdo con los resultados, se observó un aumento de las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina (figura 17). En congruencia con lo anterior, se ha reportado que las aortas de ratones sometidos a un TCE inducido por impacto cortical controlado presentan una respuesta contráctil incrementada a la noradrenalina (Chen et al., 2019). Además, existen reportes que sugieren un aumento de la expresión del RNAm del receptor α_{1A} -adrenérgico en la corteza prefrontal (Kobori et al., 2011). Sin embargo, es importante mencionar que existen estudios que sugieren una disminución de la función de los receptores α adrenérgicos en la vasculatura completa (Huerta de la Cruz et al 2022a) al día 28 postTCE que podría estar mediada por la desensibilización de los receptores adrenérgicos (Broadley, 1996).

Aunado a los mecanismos adrenérgicos, la activación del canal TRPC6 permite la entrada de calcio al citosol del MLV y, por tanto, su contracción. La activación del TRPC6 depende de la activación del TLR4, por lo que el aumento de las moléculas proinflamatorias en la aorta después de un TCE podría contribuir al incremento de las respuestas contráctiles (Chen et al., 2019). Se debe admitir que existe evidencia limitada sobre el mecanismo que subyace al aumento de las respuestas contráctiles. Sin embargo, nuestros resultados, en conjunto con los reportes previos, demuestran que existe una disfunción vascular después de un TCE severo.

7.4. La expresión de las enzimas productoras de H₂S en la aorta torácica disminuye después de un TCE severo

Como se mencionó anteriormente, el H₂S es una molécula que tiene diversos efectos en el sistema cardiovascular (Cirino et al. 2022) y sus alteraciones endógenas podrían estar implicadas en los efectos postTCE (Che et al., 2018). Por lo que decidimos estudiar la expresión de las enzimas productoras de H₂S en la aorta. Los resultados indican que existe una disminución en la expresión de las tres enzimas productoras de H₂S en la aorta de animales sometidos a un TCE severo (figura 21). En soporte a nuestros datos, se ha descrito que el TCE induce una disminución en la expresión de las enzimas: (1) CBS en el hipotálamo, el tallo cerebral (Huerta de la Cruz, 2022b), el hipocampo y la corteza (Zhang et al., 2013; 2017); (2) CSE en el hipotálamo y el tallo cerebral (Huerta de la Cruz, 2022b); y (3) la 3-MST en la corteza ipsilateral al daño (Zhang et al., 2013; 2017). Hasta nuestro conocimiento, este trabajo es el primero en evaluar la expresión de las enzimas productoras de H₂S en aortas de ratas después de la inducción de un TCE severo.

Los procesos que regulan la expresión de las enzimas pueden ocurrir en suceder a cuatro niveles e incluyen cambios epigenéticos, transcripcionales, postrcripcionales o postraduccionales. A nivel epigenético, el DNA que codifica para dos de las tres enzimas productoras de H₂S (CBS y CSE), puede ser metilado, lo que ocasiona su disminución en su expresión. Se sabe que después de un TCE severo existe una mayor cantidad de metiltransferasas como la DNMT-1/3A/3B lo que podría aumentar la probabilidad de metilación del DNA que codifica para la CBS y la CSE (Cirino et al., 2022; Mateen et al.,

2017). Sin embargo, esto no se ha demostrado experimentalmente y deberá ser analizado en nuestro sistema.

A nivel postranscripcional, la expresión de las enzimas productoras de H₂S puede modularse por microRNAs (miRNA). Los miRNAs son RNAs reguladores cortos que pueden actuar como represores de la expresión de diferentes proteínas (Dexheimery & Cochella, 2020). Se ha reportado que los miRNA que regulan la expresión de la CBS (miRNA27b y el miRNA216a) y CSE (miRNA27b y el miRNA216a) (Cirino et al., 2022) se elevan en plasma después de un TCE, lo que podría inducir una disminución de su expresión (Yang et al., 2016; Atif & Hicks, 2019). Por otra parte, nuestros datos demuestran que la 3-MST disminuye en la aorta torácica. A pesar de que no existen reportes que sugieran un posible mecanismo implicado en la disminución de la 3-MST, se sabe que la actividad de esta enzima depende del balance REDOX (Cirino et al., 2022). Por lo tanto, es posible que el estrés oxidante modifique la expresión de la 3-MST ya que contiene interruptores moleculares de detección REDOX en su estructura (Nasi et al., 2020). Además, existen mecanismos postranscripcionales que pueden regular la expresión de las enzimas, tales como la fosforilación y la sumoilación (Renga et al., 2015; Agrawal & Banerjee, 2008).

En su conjunto, nuestros resultados demuestran que el TCE induce una disminución de la expresión de las enzimas que sintetizan H₂S. Por lo que se procedió con la administración de un donador exógeno de H₂S de manera subcrónica para evitar las alteraciones sistémicas postTCE.

7.5. La administración subcrónica de NaHS no tiene efecto en la disfunción sensoriomotora ni en la ganancia de peso corporal

Acorde con nuestros resultados, el NaHS no indujo cambios significativos en la disfunción sensoriomotora postTCE. Contrario a nuestros datos, se ha reportado previamente que la administración de NaHS (3.1 mg/kg) cinco minutos después de la inducción del TCE previene el desarrollo de las alteraciones neurológicas (Jiang et al., 2013). Además, la administración de ATB-346, un donador orgánico de H₂S durante 14 días es capaz de restablecer la función motora. La discrepancia de nuestros datos con lo previamente

Discusión

reportado puede deberse a (1) el tiempo de inicio del tratamiento (5 min versus 24 h postTCE); y (2) el donador utilizado. En este sentido, el ATB-346 es un donador de H₂S derivado del naproxeno, por lo tanto, actúa tanto incrementando los niveles plasmáticos de H₂S como inhibiendo a la COX (Campolo et al., 2012).

Por otra parte, nuestros resultados demuestran que el NaHS no tuvo un efecto significativo en los cambios en el peso corporal inducidos por el TCE. Contrario a nuestros datos, se ha observado que la administración de NaHS (5.6 mg/kg) promueve la recuperación del peso corporal a largo plazo (14 días) (Huerta de la Cruz, 2022c). Asimismo, la administración de donadores de liberación lenta, como el GYY 4137, promueve la ingesta a través de la liberación del neuropéptido Y por fosforilación de la proteína AMPK en el núcleo arcuato (figura 24) (Zhou et al., 2018). A nivel periférico, el H₂S induce adipogénesis e hipertrofia de los adipocitos que conlleva a un incremento del peso corporal (Cai et al., 2018). Sin embargo, aunque el H₂S promueva la ingesta de alimento después de un TCE, existe una disfunción en la absorción de nutrientes causada por la disautonomía y un estado hipermetabólico que contribuye a la disminución de peso (Hanscom et al., 2021; Roe & Rotchwell, 1997; Yanagawa et al., 2002).

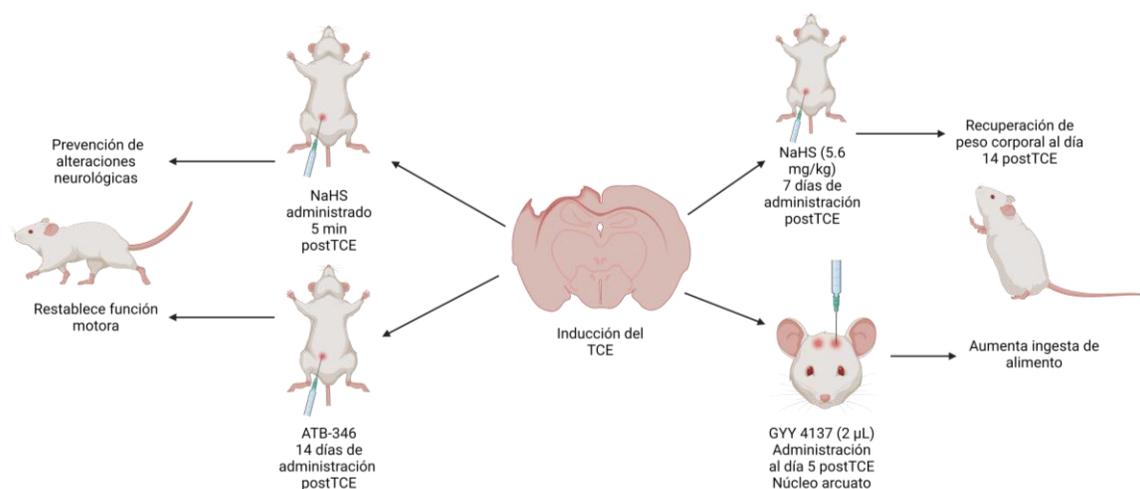


Figura 24. El efecto del H₂S exógeno en la disfunción sensoriomotora y la pérdida de peso corporal depende del tipo de donador y del tiempo de administración y de evaluación postTCE.

7.6. La administración subcrónica de NaHS evita los cambios en la frecuencia cardíaca y la presión arterial ocasionados por el TCE

De acuerdo con nuestros resultados, la administración de NaHS impidió las alteraciones en la frecuencia cardíaca y la presión arterial. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha reportado previamente que la administración de NaHS por 28 días revirtió las alteraciones en la frecuencia cardíaca en un modelo de obesidad inducido por una dieta rica en grasas (Gomez et al., 2019). Dicho efecto posiblemente este mediado por las acciones del H₂S en el nódulo sinusal del corazón (Yoo et al., 2015) o la inhibición del tono simpático cardioacelerador (Centurión, et al. 2018). Además, la administración de NaHS a las dosis de 3.1 y 5.6 mg/kg previnieron el incremento en la presión arterial postTCE (Huerta de la Cruz et al., 2022). Dicho efecto pudiera estar mediado por mecanismos a nivel central o a nivel periférico a través de la modulación de la transmisión simpática (Centurión et al., 2016; Huerta de la Cruz et al., 2022a).

7.7. La administración subcrónica de NaHS evita los cambios en los mecanismos locales del control de la función vascular

Estudios previos han demostrado que el H₂S puede regular el tono vascular produciendo vasoconstricción o vasorrelajación (Dongó et al., 2017) El efecto vasorrelajante del H₂S involucra principalmente la activación de canales de potasio (Zhao et al., 2001). En este sentido, al observar una disminución en la expresión de las enzimas productoras de H₂S, fue de nuestro interés estudiar si la relajación inducida por NaHS se alteraba después de un TCE. De acuerdo con nuestros resultados, en las aortas provenientes de animales sometidos a un TCE severo, se presenta una disminución en la respuestas vasorrelajantes inducidas por el H₂S. Este cambio pudiera estar mediado por una alteración de los blancos del H₂S en el MLV, tales como el K_{ATP} y el Kir 2.1. En este sentido, el H₂S puede persulfurar los residuos de cisteína oxidados de los canales K_{ATP} y del Kir2.1, lo que induce su apertura y, por lo tanto, la vasorrelajación (Tang et al., 2005). Se ha reportado previamente que la función de los canales K_{ATP} se ve modificada en arterias cerebrales de cerdos sometidos a un TCE (Armstead, 1997), y que la función del canal Kir 2.1 disminuye en arterias mesentéricas de ratas después de un TCE por un aumento del estrés oxidante (Sackheim et al., 2021).

Discusión

De acuerdo con nuestros resultados, la administración de NaHS indujo una reducción en el estrés oxidante en las aortas de animales sometidos a un TCE severo. Este efecto se da por represión de radicales libres como el peroxinitrito (ONOO-) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y la regulación a la alza de otras moléculas antioxidantes como es el glutatión. En la aorta, esta reducción del estrés oxidante evita el desacople de la eNOS, lo que se traduciría en la recuperación de la vasorrelajación dependiente de endotelio. Acorde con lo anterior, nuestros resultados indican que el tratamiento subcrónico con NaHS impide las alteraciones vasculares, ya que restablece la vasorrelajación dependiente de endotelio y las respuestas contráctiles (figura 16 y 17). La recuperación de la vasorrelajación dependiente de endotelio inducida por la administración del NaHS puede deberse a: 1) la disminución del estrés oxidante; y 2) aumento de la expresión y fosforilación de la eNOS.

De acuerdo con nuestros resultados, la administración de NaHS indujo un incremento en la expresión de la eNOS en la aorta de animales sometidos a un TCE severo. Este mismo efecto se ha reportado en diversos modelos como en la placa aterosclerótica (Li et al., 2017), en modelos de envejecimiento con D-galactosa (Wu et al., 2017) y en modelos murinos de formación de trombos utilizando vénulas de la oreja de ratones (Szabo, 2017). Este aumento en la expresión podría estar dado por el aumento en el miRNA-455-3p (Li et al., 2017). Por otra parte, el H₂S induce la persulfuración de la vía de Akt, lo que induce la fosforilación en el residuo de Ser¹¹⁷⁷ (Predmore et al., 2011).

De acuerdo con nuestros resultados, el tratamiento con NaHS restableció las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina. En este sentido, se ha reportado que la administración de NaHS a la dosis de 5.6 mg/kg produce una disminución de las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina en un modelo de obesidad inducida por una dieta rica en grasa (Gomez et al., 2019). Además, estudios *in situ* han demostrado que la administración de NaHS (3.1 y 5.6 mg/kg) en animales sometidos a TCE genera una disminución de las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina (Huerta de la Cruz, et al 2022a).

7.8. La administración de NaHS evita la disminución de la expresión de las enzimas productoras de H₂S inducida por el TCE

De acuerdo con nuestros resultados, la administración de NaHS evitó la disminución de la expresión de las enzimas productoras de H₂S e incluso, en el caso de la CBS, indujo un incremento por arriba del grupo Sham (figura 21). Hasta nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que relaciona el efecto del NaHS con los cambios de la expresión de las enzimas productoras de H₂S en vasos sanguíneos postTCE, específicamente en la aorta. Este incremento puede explicarse por dos mecanismos que involucran factores de transcripción: 1) la vía de la molécula Sp1 (proteína específica 1), en la cual la Sp1 persulfurada se une a las regiones promotoras para la transcripción de genes de respuesta; y 2) la vía del Nrf2 (factor nuclear eritroide 2), en la que la persulfuración de la proteína Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch) en el residuo de Cis¹⁵ produce la disociación del Nrf2 y promueve su translocación al núcleo (Corsello et al., 2018). Conforme a nuestros resultados, se ha reportado que, en animales que fueron sometidos a un TCE severo, la administración subcrónica de NaHS a 3.1 mg/kg indujo un aumento en la expresión de las enzimas productoras de H₂S en el hipotálamo y tallo cerebral (Huerta de la Cruz, 2022b). Además, en otros modelos, como el de envejecimiento acelerado, se ha demostrado que el tratamiento con donadores de H₂S aumentan la expresión de las enzimas en la aorta y en el corazón (Wu et al., 2017).

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que la administración de NaHS previene la disfunción vascular postTCE a través de: 1) la reducción en la formación de ROS; y 2) la expresión y fosforilación de la eNOS, y todos estos efectos pueden ser por el aumento de la expresión de las enzimas productoras de H₂S (figura 25).

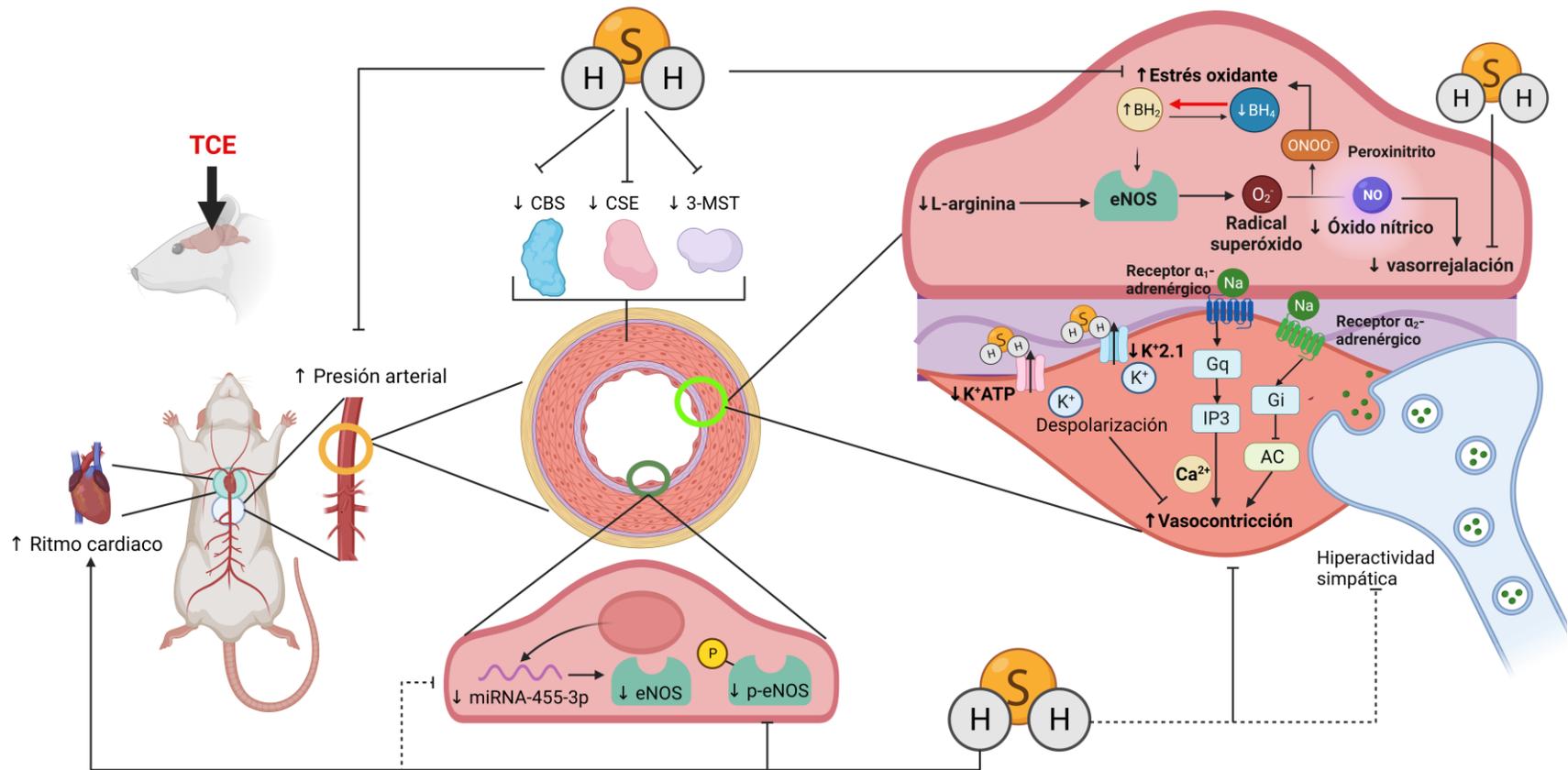


Figura 25. Resumen de los efectos de la administración exógena de H₂S en las alteraciones vasculares postTCE. La administración de NaHS evitó el aumento de la presión arterial y el ritmo cardíaco. Asimismo, evitó el decremento de las enzimas productoras de H₂S, evitó el aumento de la formación de ROS, aumentó la expresión de la enzima eNOS posiblemente por aumentar al miRNA-455-3p y evitó la disminución de la fosforilación de la eNOS. Lo que conlleva a la restauración de la función vascular, disminuyendo la vasoconstricción y aumentando la vasorrelajación. Las líneas continuas son mecanismos demostrados en este trabajo mientras que, las líneas punteadas son mecanismos que se sugieren del H₂S.

8. Conclusión

El H₂S evita el desarrollo de la hipertensión arterial postTCE al restaurar la función vascular, disminuyendo el estrés oxidante y restaurando la expresión proteínica de las enzimas productoras de H₂S, así como la activación de la eNOS. Sin embargo, no tiene efectos en las alteraciones sensoriomotoras ni en la ganancia de peso ocasionada por el TCE.

9. Perspectivas

El presente estudio es el primero en evaluar el efecto de la administración subcrónica de NaHS en los vasos sanguíneos después de la inducción de un TCE severo. Dicho lo anterior, es importante continuar con la investigación del efecto del NaHS en otras áreas del sistema. Por ello, a continuación, se enuncian algunas perspectivas derivadas de este proyecto.

- Evaluar, a largo plazo, el efecto de la administración subcrónica de NaHS en un modelo de TCE severo.
- Evaluar la participación del sistema nervioso parasimpático en las consecuencias cardiovasculares postTCE, así como los efectos de la administración de NaHS en dicho sistema.
- Se ha reportado que la sobreactivación de los receptores β -adrenérgicos después de un TCE por liberación excesiva de catecolaminas son capaces de inducir un aumento de ROS en el miocardio. Dado que la molécula de H_2S es un importante antioxidante, sería importante evaluar el efecto de la administración subcrónica de NaHS en los niveles de ROS en el corazón después de la inducción de un TCE.
- Nuestros resultados nos indican que, después de un TCE severo, existe un aumento de las respuestas contráctiles mediadas por receptores α -adrenérgicos, por lo que sería importante evaluar los mecanismos transduccionales por los cuales el TCE induce un aumento a corto plazo de las respuestas contráctiles, al igual que el efecto que tiene la administración de NaHS sobre dichos mecanismos para reducir las respuestas contráctiles.
- Determinar si el efecto que tiene la administración de NaHS cambia de acuerdo con la severidad del TCE.

- Se ha reportado que, en arterias cerebrales, se modifican los canales de potasio en el músculo liso vascular, sobre todo los K_{ATP} y los Kir 2.1. Sin embargo, no se ha evaluado la actividad de estos canales en vasos sanguíneos sistémicos después de un TCE, por lo que es importante evaluar las modificaciones que suceden en los canales postTCE, al igual que los efectos de la administración de NaHS sobre estos canales.
- Evaluar la combinación de fármacos que tienen efectos neurológicos postTCE como es el propilparabeno (preclínica) o glibenclamida (clínica) en conjunto con la administración de NaHS para las consecuencias tanto centrales como periféricas postTCE.

10. Referencias

- (a)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. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1). doi:10.1186/s12974-019-1407-6
- (b)Chen, Q., Zheng, W., Chen, X., Li, X., Wang, L., Qin, W., ... Chen, N. (2019). Reorganization of the somatosensory pathway after subacute incomplete cervical cord injury. *NeuroImage: Clinical*, 101674. doi:10.1016/j.nicl.2019.101674
- AANS (American Association of Neurological Surgeons) (2020). Traumatic brain injury [Noviembre 29, 2021]. <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Traumatic-Brain-Injury>
- Abe, K., & Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *The Journal of Neuroscience*, 16(3), 1066–1071. doi:10.1523/jneurosci.16-03-01066.1996
- Agrawal, N., & Banerjee, R. (2008). Human Polycomb 2 Protein Is a SUMO E3 Ligase and Alleviates Substrate-Induced Inhibition of Cystathionine β -Synthase Sumoylation. *PLoS ONE*, 3(12), e4032. doi:10.1371/journal.pone.0004032
- Al-Magableh, M. R., Kemp-Harper, B. K., & Hart, J. L. (2014). Hydrogen sulfide treatment reduces blood pressure and oxidative stress in angiotensin II-induced hypertensive mice. *Hypertension Research*, 38(1), 13–20. doi:10.1038/hr.2014.125
- Aranda, A., Sequedo, L., Tolosa, L., Quintas, G., Burello, E., Castell, J. V., & Gombau, L. (2013). Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicology in Vitro*, 27(2), 954–963. doi:10.1016/j.tiv.2013.01.016
- Armstead WM. (1997) Brain injury impairs ATP-sensitive K⁺ channel function in piglet cerebral arteries. *Stroke*. Nov;28(11):2273-9; discussion 2280. doi: 10.1161/01.str.28.11.2273. PMID: 9368576.
- Atif, H., & Hicks, S. D. (2019). A Review of MicroRNA Biomarkers in Traumatic Brain Injury. *Journal of Experimental Neuroscience*, 13, 117906951983228. doi:10.1177/1179069519832286

Referencias

- Baguley, I. J., Heriseanu, R. E., Cameron, I. D., Nott, M. T., & Slewa-Younan, S. (2007). A Critical Review of the Pathophysiology of Dysautonomia Following Traumatic Brain Injury. *Neurocritical Care*, 8(2), 293–300. doi:10.1007/s12028-007-9021-3
- Bao, W., Lin, Y., Chen, Z. (2021). The Peripheral Immune System and Traumatic Brain Injury: Insight into the role of T-helper cells. *International Journal of Medical Sciences*, 1816), 3644–3651. <https://doi.org/10.7150/ijms.46834>
- Belani, K., Hottinger, D., Kozhimannil, T., Prielipp, R., & Beebe, D. (2014). Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 30(4), 462. doi:10.4103/0970-9185.142799
- Bharath, S., Radhakrishnan, M., & Umamaheswara Rao, G. S. (2020). Hemodynamic Changes During Surgical Decompression in Traumatic Brain Injury Patients. *World Neurosurgery*, 136, e553–e558. doi:10.1016/j.wneu.2020.01.066
- Bhowmick S, D'Mello V, Ponery N, Abdul-Muneer PM. (2018) Neurodegeneration and Sensorimotor Deficits in the Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Brain Sci*. Jan 6;8(1):11. doi: 10.3390/brainsci8010011. PMID: 29316623; PMCID: PMC5789342.
- 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 Injury*, 31(2), 247–259. doi:10.1080/02699052.2016.1226385
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., & Cohen, R. A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, 368(6474), 850–853. doi:10.1038/368850a0
- Bostan, A. C., & Strick, P. L. (2018). The basal ganglia and the cerebellum: nodes in an integrated network. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(6), 338–350. doi:10.1038/s41583-018-0002-7
- Broadley K., (1996). *Autonomic pharmacology*. Editorial Taylor & Francis,
- Brozovich, F. V., Nicholson, C. J., Degen, C. V., Gao, Y. Z., Aggarwal, M., & Morgan, K. G. (2016). Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacological Reviews*, 68(2), 476–532. doi:10.1124/pr.115.010652

Referencias

- Cai, J.; Shi, X.; Wang, H.; Fan, J.; Feng, Y.; Lin, X.; Yang, J.; Cui, Q.; Tang, C.; Xu, G.; et al. Cystathionine γ lyase-hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor γ activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 2016, 1861, 419–429.
- Campolo, M., Esposito, E., Ahmad, A., Di Paola, R., Paterniti, I., Cordaro, M., ... Cuzzocrea, S. (2014). Hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor ATB-346 enhances motor function and reduces cortical lesion volume following traumatic brain injury in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1). doi:10.1186/s12974-014-0196-1
- Cao, X., Ding, L., Xie, Z., Yang, Y., Whiteman, M., Moore, P. K., & Bian, J.-S. (2018). A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer? *Antioxidants & Redox Signaling*. doi:10.1089/ars.2017.7058
- Carrillo-Esper R, Meza-Márquez JM. Trauma craneoencefálico. *Rev Mex Anest.* 2015;38(Suppl: 3):433-434.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2017a). Traumatic brain injury & concussion. [Noviembre 29, 2021]. <https://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/index.html>.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2017b). Moderate and Severe TBI | Concussion | Traumatic Brain Injury | CDC Injury Center. [marzo 28, 2022], <https://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/moderate-severe/index.html>
- 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. *European Journal of Pharmacology*, 823, 35–40. doi:10.1016/j.ejphar.2018.01.030
- Centurión, D., De la Cruz, S. H., 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. *European Journal of Pharmacology*, 770, 40–45. doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.057
- Chachlaki, K., & Prevot, V. (2019). Nitric oxide signalling in the brain and its control of bodily functions. *British Journal of Pharmacology*. doi:10.1111/bph.14800

Referencias

- Chaudhry R, Miao JH, Rehman A. Physiology, Cardiovascular. [Actualizado 2021 Nov 14]. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493197/>
- Chen, L., Yung, K., Chan, Y., Shum, D., & Bolam, J. (2008). The proNGF-p75NTR-Sortilin Signalling Complex as New Target for the Therapeutic Treatment of Parkinsons Disease. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7(6), 512–523. doi:10.2174/187152708787122923
- Chen, S., Guo F., Liu X., Xi J., Xue M., Guo Y., Wen J., Dong L. & Chen Z. (2022). Roles of the RhoA-ROCK Signaling Pathway in the Endothelial H₂S Production and Vasodilation in Rat Cerebral Arteries. *ACS Omega*. 7. 10.1021/acsomega.2c00996.
- Chen, Y., Medhora, M., Falck, J. R., Pritchard, K. A., & Jacobs, E. R. (2006). Mechanisms of activation of eNOS by 20-HETE and VEGF in bovine pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 291(3), L378–L385. doi:10.1152/ajplung.00424.2005
- Cornelius, C., Crupi, R., Calabrese, V., Graziano, A., Milone, P., Pennisi, G., ... Cuzzocrea, S. (2013). Traumatic Brain Injury: Oxidative Stress and Neuroprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(8), 836–853. doi:10.1089/ars.2012.4981Hadi,
- Corral, L., Javierre, C. F., Ventura, J. L., Marcos, P., Herrero, J. I., & Mañez, R. (2012). Impact of non-neurological complications in severe traumatic brain injury outcome. *Critical Care*, 16(2), R44. doi:10.1186/cc11243
- Corsello, T., Komaravelli, N., & Casola, A. (2018). Role of Hydrogen Sulfide in NRF2- and Sirtuin-Dependent Maintenance of Cellular Redox Balance. *Antioxidants*, 7(10), 129. doi:10.3390/antiox7100129
- Dev, R., Hui, D., Chisholm, G., Delgado-Guay, M., Dalal, S., Del Fabbro, E., & Bruera, E. (2015). Hypermetabolism and symptom burden in advanced cancer patients evaluated in a cachexia clinic. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 6(1), 95–98. doi:10.1002/jcsm.12014
- Dewan, M. C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R. E., Hung, Y.-C., Punchak, M., ... Park, K. B. (2018). Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*, 1–18. doi:10.3171/2017.10.jns17352

Referencias

- Dexheimer, P. J., & Cochella, L. (2020). MicroRNAs: From Mechanism to Organism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. doi:10.3389/fcell.2020.00409
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601–605. doi:10.1038/21224
- Dongó, E., Beliczai-Marosi, G., Dybvig, A. S., & Kiss, L. (2017). The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric Oxide*. doi:10.1016/j.niox.2017.10.010
- Fan, X., DU, F.-H., Tian, J.-P. (2012). The electrocardiographic changes in acute brain injury patients. *Chinese Medical Journal*, 125(19), 3430–3433. PMID: 23044301
- Faridar, A., Bershad, E. M., Emiru, T., Iaizzo, P. A., Suarez, J. I., & Divani, A. A. (2011). Therapeutic Hypothermia in Stroke and Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neurology*, 2. doi:10.3389/fneur.2011.00080
- Ferguson, A. V., Latchford, K. J., & Samson, W. K. (2008). The paraventricular nucleus of the hypothalamus – a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(6), 717–727. doi:10.1517/14728222.12.6.717
- Ferguson, A. V., Latchford, K. J., & Samson, W. K. (2008). The paraventricular nucleus of the hypothalamus – a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 12(6), 717–727. doi:10.1517/14728222.12.6.717
- Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., & Banerjee, R. (2017). Chemical Biology of H₂S Signaling through Persulfidation. *Chemical Reviews*, 118(3), 1253–1337. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00205
- Fleming, I. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 459(6), 793–806. doi:10.1007/s00424-009-0767-7
- Foley, N., Marshall, S., Pikul, J., Salter, K., & Teasell, R. (2008). Hypermetabolism following Moderate to Severe Traumatic Acute Brain Injury: A Systematic Review. *Journal of Neurotrauma*, 25(12), 1415–1431. doi:10.1089/neu.2008.0628

Referencias

- Frey, L. C., Hellier, J., Unkart, C., Lepkin, A., Howard, A., Hasebroock, K., ... Staley, K. (2009). A novel apparatus for lateral fluid percussion injury in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 177(2), 267–272. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.10.02
- Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. (1989). *FASEB J*. Jul;3(9):2007-18. PMID: 2545495.
- Gabrielian, L., Willshire, L. W., Helps, S. C., van den Heuvel, C., Mathias, J., & Vink, R. (2011). Intracranial Pressure Changes following Traumatic Brain Injury in Rats: Lack of Significant Change in the Absence of Mass Lesions or Hypoxia. *Journal of Neurotrauma*, 28(10), 2103–2111. doi:10.1089/neu.2011.1785
- Gaddam, S. S. K., Buell, T., & Robertson, C. S. (2015). Systemic manifestations of traumatic brain injury. *Traumatic Brain Injury, Part I*, 205–218. doi:10.1016/b978-0-444-52892-6.00014-3
- Gao, F., Griffin, N., Faulkner, S., Rowe, C. W., Williams, L., Roselli, S., ... Hondermarck, H. (2018). The neurotrophic tyrosine kinase receptor TrkA and its ligand NGF are increased in squamous cell carcinomas of the lung. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-26408-2
- Geng, B., Chang, L., Pan, C., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., ... Tang, C. (2004). Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(3), 756–763. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.094
- 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 restore cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats. *European Journal of Pharmacology*, 172707. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172707
- H. A., Carr, C. S., & Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular health and risk management*, 1(3), 183–198.
- Haarbauer-Krupa J, Pugh MJ, Prager EM, Harmon N, Wolfe J, Yaffe K. (2021). Epidemiology of Chronic Effects of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. Aug 17. doi: 10.1089/neu.2021.0062. Epub ahead of print. PMID: 33947273.
- Hadi, H. A., Carr, C. S., & Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular health and risk management*, 1(3), 183–198.

Referencias

- Hammond, F. M., Corrigan, J. D., Ketchum, J. M., Malec, J. F., Dams-O'Connor, K., Hart, T., ... Whiteneck, G. G. (2019). Prevalence of Medical and Psychiatric Comorbidities Following Traumatic Brain Injury. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 34(4), E1–E10. doi: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. *The Journal of clinical investigation*, 131(12), e143777. <https://doi.org/10.1172/JCI143777>
- Heffernan, D. S., Inaba, K., Arbabi, S., & Cotton, B. A. (2010). Sympathetic Hyperactivity After Traumatic Brain Injury and the Role of Beta-Blocker Therapy. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 69(6), 1602–1609. doi:10.1097/ta.0b013e3181f2d3e8
- Hemmings, B. A., & Restuccia, D. F. (2012). PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a011189–a011189. doi:10.1101/cshperspect.a011189
- 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. *Journal of neurology*, 264(9), 1956–1967. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8581-1>
- Hosoki, R., Matsuki, N., & Kimura, H. (1997). The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(3), 527–531. doi:10.1006/bbrc.1997.6878
- Huang CW, Moore PK. H2S synthesizing enzymes: biochemistry and molecular aspects. In: Moore PK, Whiteman M, editors. (2015) *Chemistry, Biochemistry and Pharmacology of Hydrogen Sulfide*. Basel: Springer. p. 3–25.
- Huang, C. W., & Moore, P. K. (2015). H2S Synthesizing Enzymes: Biochemistry and Molecular Aspects. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 3–25. doi:10.1007/978-3-319-18144-8_1

Referencias

- Huerta de la Cruz S, Rocha L, Santiago-Castañeda C, Sánchez-López A, Pinedo-Rodríguez AD, Medina-Terol GJ, Centurión D. (2022a) Hydrogen Sulfide Subchronic Treatment Improves Hypertension Induced by Traumatic Brain Injury in Rats through Vasopressor Sympathetic Outflow Inhibition. *J Neurotrauma*. doi: 10.1089/neu.2020.7552
- Huerta de la Cruz, S. (2022c). Efecto del sulfuro de hidrógeno en las alteraciones cardiovasculares inducidas por el traumatismo craneoencefálico en rata [tesis de doctorado]. Cinvestav-Sede Sur
- Huerta de la Cruz, S., Rodríguez-Palma, E.J., Santiago-Castañeda, C.L. et al. (2022b) 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*. <https://doi.org/10.1007/s11011-022-01033-1>
- Jenkins, P. O., Mehta, M. A., & Sharp, D. J. (2016). Catecholamines and cognition after traumatic brain injury. *Brain*, 139(9), 2345–2371. doi:10.1093/brain/aww128
- Jia, J., Xiao, Y., Wang, W., Qing, L., Xu, Y., Song, H., ... Cheng, J. (2013). Differential mechanisms underlying neuroprotection of hydrogen sulfide donors against oxidative stress. *Neurochemistry International*, 62(8), 1072–1078. doi:10.1016/j.neuint.2013.04.001
- 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. *Journal of Surgical Research*, 184(2), e27–e35. doi:10.1016/j.jss.2013.03.067
- 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. *Journal of Neurotrauma*, 32(17), 1333–1346. doi:10.1089/neu.2014.3785
- Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. (2014) eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des*;20(22):3579-94. doi: 10.2174/13816128113196660748. PMID: 24180381.

Referencias

- Karimi, S. A., Hosseinmardi, N., Janahmadi, M., Sayyah, M., & Hajisoltani, R. (2017). The protective effect of hydrogen sulfide (H₂S) on traumatic brain injury (TBI) induced memory deficits in rats. *Brain Research Bulletin*, 134, 177–182. doi:10.1016/j.brainresbull.2017.0
- Kaur P, Sharma S. (2018) Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol.* ;16(8):1224-1238. doi: 10.2174/1570159X15666170613083606. PMID: 28606040.
- Khalid F, Yang GL, McGuire JL, Robson MJ, Foreman B, Ngwenya LB, Lorenz JN. (2019) Autonomic dysfunction following traumatic brain injury: translational insights. *Neurosurg Focus.* Nov 1;47(5):E8. doi: 10.3171/2019.8.FOCUS19517. PMID: 31675718.
- Kharrazian D. (2015) Traumatic Brain Injury and the Effect on the Brain-Gut Axis. *Altern Ther Health Med.* Aug;21 Suppl 3:28-32. PMID: 26348611.
- Kinoshita, K. (2016). Traumatic brain injury: pathophysiology for neurocritical care. *Journal of Intensive Care*, 4(1). doi:10.1186/s40560-016-0138-3
- Klabunde, R. E. (2012). *Cardiovascular physiology concepts* (1^o edición). Lippincott Williams and Wilkins.
- 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. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.1
- Kolluru, G. K., Siamwala, J. H., & Chatterjee, S. (2010). eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*, 92(9), 1186–1198. doi:10.1016/j.biochi.2010.03.020
- Krishnamoorthy, V., Rowhani-Rahbar, A., Chaikittisilpa, N., Gibbons, E. F., Rivara, F. P., Temkin, N. R., ... Vavilala, M. S. (2016). Association of Early Hemodynamic Profile and the Development of Systolic Dysfunction Following Traumatic Brain Injury. *Neurocritical Care*, 26(3), 379–387. doi:10.1007/s12028-016-0335-x
- Krüger-Genge, Blocki, Franke, & Jung. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4411. doi:10.3390/ijms20184411

Referencias

- Kumar, M.; Sandhir, R. (2018) Neuroprotective Effect of Hydrogen Sulfide in Hyperhomocysteinemia Is Mediated Through Antioxidant Action Involving Nrf2. *Neuromol. Med*, 20, 475–490.
- Kuriakose, M., Younger, D., Ravula, A. R., Alay, E., Rama Rao, K. V., & Chandra, N. (2019). Synergistic Role of Oxidative Stress and Blood-Brain Barrier Permeability as Injury Mechanisms in the Acute Pathophysiology of Blast-induced Neurotrauma. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-44147-w
- Larson, B. E., Stockwell, D. W., Boas, S., Andrews, T., Wellman, G. C., Lockette, W., & Freeman, K. (2012). Cardiac Reactive Oxygen Species After Traumatic Brain Injury. *Journal of Surgical Research*, 173(2), e73–e81. doi:10.1016/j.jss.2011.09.056
- Lee, Y.-L., Lim, S.-W., Zheng, H.-X., Chang, W.-T., Nyam, T.-T. E., Chio, C.-C., ... Wang, C.-C. (2020). The Short-Term Effects of Isolated Traumatic Brain Injury on the Heart in Experimental Healthy Rats. *Neurocritical Care*. doi:10.1007/s12028-019-00902-5
- Li, H., Mani, S., Wu, L., Fu, M., Shuang, T., Xu, C., & Wang, R. (2017). The interaction of estrogen and CSE/H2S pathway in the development of atherosclerosis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 312(3), H406–H414. doi:10.1152/ajpheart.00245.2016
- Llorens, S., Jordán, J., & Nava, E. (2002). The nitric oxide pathway in the cardiovascular system. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 58(3), 179–188. doi:10.1007/bf03179855
- Lutton, E. M., Farney, S. K., Andrews, A. M., Shuvaev, V. V., Chuang, G.-Y., Muzykantov, V. R., & Ramirez, S. H. (2019). Endothelial Targeted Strategies to Combat Oxidative Stress: Improving Outcomes in Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neurology*, 10. doi:10.3389/fneur.2019.00582
- Lv, B., Chen, S., Tang, C., Jin, H., Du, J., & Huang, Y. (2020). Hydrogen Sulfide and Vascular Regulation-An Update. *Journal of Advanced Research*. doi:10.1016/j.jare.2020.05.007
- Mateen, B. A., Hill, C. S., Biddie, S. C., & Menon, D. K. (2017). DNA Methylation: Basic Biology and Application to Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 34(16), 2379–2388. doi:10.1089/neu.2017.5007

Referencias

- Mattapally, S., & Banerjee, S. K. (2011). Nitric oxide: Redox balance, protein modification and therapeutic potential in cardiovascular system. *IIOAB Journal*, 2(6), 29-38.
- McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, Faden AL. (1989) Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience*; 28(1):233-44. doi: 10.1016/0306-4522(89)90247-9. PMID: 2761692.
- McIntosh, T. K., Noble, L., Andrews, B., & Daden, A. I. (1987). Traumatic Brain Injury in the Rat: Characterization of a Midline Fluid-Percussion Model. *Central Nervous System Trauma*, 4(2), 119–134. doi:10.1089/cns.1987.4.119
- McMahon, C. G., Kenny, R., Bennett, K., Little, R., & Kirkman, E. (2011). Effect of Acute Traumatic Brain Injury on Baroreflex Function. *Shock*, 35(1), 53–58. doi:10.1097/shk.0b013e3181e687c6
- Mena, J. H., Sanchez, A. I., Rubiano, A. M., Peitzman, A. B., Sperry, J. L., Gutierrez, M. I., & Puyana, J. C. (2011). Effect of the Modified Glasgow Coma Scale Score Criteria for Mild Traumatic Brain Injury on Mortality Prediction: Comparing Classic and Modified Glasgow Coma Scale Score Model Scores of 13. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care*, 71(5), 1185–1193. doi:10.1097/ta.0b013e31823321f8
- Meng, G., Zhao, S., Xie, L., Han, Y., & Ji, Y. (2017). Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, 175(8), 1146–1156. doi:10.1111/bph.13825
- Mosconi, M. W., & Sweeney, J. A. (2015). Sensorimotor dysfunctions as primary features of autism spectrum disorders. *Science China Life Sciences*, 58(10), 1016–1023. doi:10.1007/s11427-015-4894-4
- Motulsky H. & Christopoulos A. (2004). *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. Oxford University Press, ISBN: 0198038348, 9780198038344 pp 15-16.
- Mustafa AG, Alshboul OA. (2013) Pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurosciences (Riyadh)*. Jul;18(3):222-34. PMID: 23887212.
- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., ... Snyder, S. H. (2009). H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Science Signaling*, 2(96), ra72–ra72. doi:10.1126/scisignal.2000464

Referencias

- Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Stepan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K., ... Snyder, S. H. (2011). Hydrogen Sulfide as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Sulphydrates Potassium Channels. *Circulation Research*, 109(11), 1259–1268. doi:10.1161/circresaha.111.240242
- Nagpure, B. V., & Bian, J.-S. (2016). Interaction of Hydrogen Sulfide with Nitric Oxide in the Cardiovascular System. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–16. doi:10.1155/2016/6904327
- Najafipour, H., Siahposht Khachaki, A., 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. *Iranian biomedical journal*, 18(4), 225–231. <https://doi.org/10.6091/ibj.13222.2014>
- Nasi, S., Ehrichiou, D., Chatzianastasiou, A., Nagahara, N., Papapetropoulos, A., Bertrand, J., ... Busso, N. (2020). The protective role of the 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)-hydrogen sulfide (H₂S) pathway against experimental osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 22(1). doi:10.1186/s13075-020-02147-6
- National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 402, Hydrogen sulfide. Recuperado el 14 de abril del 2022 en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrogen-sulfide>.
- Ng, H. H., Yildiz, G. S., Ku, J. M., Miller, A. A., Woodman, O. L., & Hart, J. L. (2017). Chronic NaHS treatment decreases oxidative stress and improves endothelial function in diabetic mice. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 14(3), 246–253. doi:10.1177/1479164117692766
- Ng, S. Y., & Lee, A. Y. W. (2019). Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. doi:10.3389/fncel.2019.00528
- Nicholls, P. (1975). The effect of sulphide on cytochrome aa3. Isosteric and allosteric shifts of the reduced alpha-peak. *Biochim. Biophys. Acta* 1975, 396, 24–35
- Nuñez, I. (2015) "Traumatic Brain Injury Causes Endothelial Dysfunction In Mesenteric Arteries 24 Hrs After Injury". Graduate College Dissertations and Theses. 362. <https://scholarworks.uvm.edu/graddis/362>

Referencias

- Ortiz, M.I. (2016). Baseline Values of the SCAT in Mexican Football Association Players. *International Journal of Sports and Exercise Medicine*, 2 (1). doi: 10.23937/2469-5718/1510037
- Oubaha, M., & Gratton, J.-P. (2009). Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC contributes to angiotensin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability in vitro. *Blood*, 114(15), 3343–3351. doi:10.1182/blood-2008-12-196584
- Pan, L.-L., Qin, M., Liu, X.-H., & Zhu, Y.-Z. (2017). The Role of Hydrogen Sulfide on Cardiovascular Homeostasis: An Overview with Update on Immunomodulation. *Frontiers in Pharmacology*, 8. doi:10.3389/fphar.2017.00686
- Paul, B. D., & Snyder, S. H. (2015). Protein Sulfhydration. *Hydrogen Sulfide in Redox Biology, Part B*, 79–90. doi:10.1016/bs.mie.2014.11.021
- Perl, K., Ushakov, K., Pozniak, Y., Yizhar-Barnea, O., Bhonker, Y., Shivatzki, S., ... Shamir, R. (2017). Reduced changes in protein compared to mRNA levels across non-proliferating tissues. *BMC Genomics*, 18(1). doi:10.1186/s12864-017-3683-9
- Pierce JE, Smith DH, Trojanowski JQ, McIntosh TK. (1998) Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience*. 87(2):359-69. doi: 10.1016/s0306-4522(98)00142-0. PMID: 9740398.
- Prathep, S., Sharma, D., Hallman, M., Joffe, A., Krishnamoorthy, V., Mackensen, G. B., & Vavilala, M. S. (2014). Preliminary report on cardiac dysfunction after isolated traumatic brain injury. *Critical care medicine*, 42(1), 142–147. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318298a890>
- Predmore, B. L., Julian, D., & Cardounel, A. J. (2011). Hydrogen Sulfide Increases Nitric Oxide Production from Endothelial Cells by an Akt-Dependent Mechanism. *Frontiers in Physiology*, 2. doi:10.3389/fphys.2011.00104
- Ramasamy, S. K. (2017). Structure and Functions of Blood Vessels and Vascular Niches in Bone. *Stem Cells International*, 2017, 1–10. doi:10.1155/2017/5046953
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 24(5), 981–990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008

Referencias

- Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, Distrutti E, Fiorucci S. (2009). Bile-acid-activated farnesoid X receptor regulates hydrogen sulfide production and hepatic microcirculation. *World J Gastroenterol*. May 7;15(17):2097-108. doi: 10.3748/wjg.15.2097. PMID: 19418582; PMCID: PMC2678580.
- Renga, B. (2011). Hydrogen Sulfide Generation in Mammals: The Molecular Biology of Cystathionine- β -Synthase (CBS) and Cystathionine- γ -Lyase (CSE). *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 10(2), 85–91. doi:10.2174/187152811794776286
- Renga, B., Bucci, M., Cipriani, S., Carino, A., Monti, M. C., Zampella, A., ... Fiorucci, S. (2015). Cystathionine γ -lyase, a H₂S-generating enzyme, is a GPBAR1-regulated gene and contributes to vasodilation caused by secondary bile acids. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 309(1), H114–H126. doi:10.1152/ajpheart.00087.2015
- Rimaz S, Ashraf A, Marzban S, Haghighi M, Zia Ziabari SM, Biazar G, Rimaz S, Omidi S. (2019). Significance of Cardiac Troponin I Elevation in Traumatic Brain Injury Patients. *Anesth Pain Med*; 9(2):e90858. doi: 10.5812/aapm.90858. PMID: 31341829; PMCID: PMC6614916.
- Roe, S. Y., & Rothwell, N. J. (1997). Whole Body Metabolic Responses to Brain Trauma in the Rat. *Journal of Neurotrauma*, 14(6), 399–408. doi:10.1089/neu.1997.14.399
- Rowe, R. K., Rumney, B. M., May, H. G., Permana, P., Adelson, P. D., Harman, S. M., ... Thomas, T. C. (2016). Diffuse traumatic brain injury affects chronic corticosterone function in the rat. *Endocrine Connections*, 5(4), 152–166. doi:10.1530/ec-16-0031
- Rzheutskaya, R. E. (2012). Characteristics of Hemodynamic Disorders in Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *Critical Care Research and Practice*, 2012, 1–11. doi:10.1155/2012/606179
- Sabet, N., Soltani, Z., & Khaksari, M. (2021). Multipotential and systemic effects of traumatic brain injury. *Journal of Neuroimmunology*, 357, 577619. doi:10.1016/j.jneuroim.2021.577619
- Sackheim, A. M., Stockwell, D., Villalba, N., Haines, L., Scott, C. L., Russell, S., ... Freeman, K. (2017). Traumatic brain injury impairs sensorimotor function in mice. *Journal of Surgical Research*, 213, 100–109. doi:10.1016/j.jss.2017.02.016

Referencias

- Sackheim, A. M., Villalba, N., Sancho, M., Harraz, O. F., Bonev, A. D., D'Alessandro, A., ... Freeman, K. (2021). Traumatic Brain Injury Impairs Systemic Vascular Function through Disruption of Inward-Rectifier Potassium Channels. *Function*, 2(3). doi:10.1093/function/zqab018
- Sakai, K., Kitagawa, T., Suzuki, K. et al. (2022) Paroxysmal sympathetic hyperactivity following acute diffuse brain swelling due to traumatic brain injury: a case report with good clinical outcome. *Egypt J Neurosurg* 37, 7. <https://doi.org/10.1186/s41984-022-00146-0>
- Sande, A., & West, C. (2010). Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(2), 177–190. doi:10.1111/j.1476-4431.2010.00527.x
- Sankaralingam, S., Xu, H., & Davidge, S. T. (2009). Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovascular Research*, 85(1), 194–203. doi:10.1093/cvr/cvp277
- Santhanam, A. V. R., d' Uscio, L. V., He, T., Das, P., Younkin, S. G., & Katusic, Z. S. (2015). Uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in cerebral vasculature of Tg2576 mice. *Journal of Neurochemistry*, 134(6), 1129–1138. doi:10.1111/jnc.13205
- 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. *Journal of Alzheimer's Disease*, 1–12. doi:10.3233/jad-200914
- Schwulst, S. J., Trahanas, D. M., Saber, R., Perlman, H. (2013). Traumatic Brain Injury-Induced Alterations in Peripheral Immunity. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 75(5), 780–788. doi.org/10.1097/TA.0b013e318299616a
- Šedý, J., Kuneš, J., & Zicha, J. (2015). Pathogenetic Mechanisms of Neurogenic Pulmonary Edema. *Journal of Neurotrauma*, 32(15), 1135–1145. doi:10.1089/neu.2014.3609
- Segovia-Oropeza, M., Santiago-Castañeda, C., Orozco-Suárez, S., Concha, L., & Rocha, L. (2020). Sodium cromoglycate decreases sensorimotor impairment and hippocampal

Referencias

- alterations induced by severe traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*. doi: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. *Journal of Neurotrauma*, 34(5), 1086–1096. doi:10.1089/neu.2016.4616
- Shen, Y., Shen, Z., Luo, S., Guo, W., & Zhu, Y. Z. (2015). The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 1–13. doi:10.1155/2015/925167
- Sillesen, M., Rasmussen, L. S., Jin, G., Jepsen, C. H., Imam, A., Hwabejire, J. O., ... Alam, H. B. (2014). Assessment of coagulopathy, endothelial injury, and inflammation after traumatic brain injury and hemorrhage in a porcine model. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 76(1), 12–20. doi:10.1097/ta.0b013e3182aaa675
- Silva-Velasco, D. L., de la Cruz, S. H., Medina-Terol, G. J., Beltran-Ornelas, J. H., Sánchez-López, A., Gomez, C. B., & Centurión, D. (2019). Chronic administration of NaHS and L-Cysteine restore cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats. *European Journal of Pharmacology*, 172707. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172707
- Siwicka-Gieroba D, Robba C, Poleszczuk J, Debowska M, Waniewski J, Badenes R, Jaroszynski A, Piasek E, Kotfis K, Biernawska J, Dabrowski W. (2021) Changes in Subendocardial Viability Ratio in Traumatic Brain Injury Patients. *Brain Connect*. 11(5):349-358. doi: 10.1089/brain.2020.0850.
- Smith A., Putta P., Driscoll E., Chaudhuri P., Birnbaumer L., Rosenbaum M., & Graham L. (2020). TRPC6 deficiency promotes smooth muscle cells dedifferentiation and increased proliferation after arterial injury. *JVS: Vascular Science*. 1. 10.1016/j.jvssci.2020.07.002.
- Szabo, C. (2017). Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 312(1), C3–C15. doi:10.1152/ajpcell.00282.2016
- Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2017). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and

Referencias

- H 2 S Biosynthesis Inhibitors . *Pharmacological Reviews*, 69(4), 497–564. doi:10.1124/pr.117.014050
- Tang Q, Wu X, Weng W, Li H, Feng J, Mao Q, Gao G, Jiang J. (2017) The preventive effect of dexmedetomidine on paroxysmal sympathetic hyperactivity in severe traumatic brain injury patients who have undergone surgery: a retrospective study. *PeerJ*;5:e2986. doi: 10.7717/peerj.2986. PMID: 28229021; PMCID: PMC5314954.
- Tang, G. (2005). Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle. *Molecular Pharmacology*. doi:10.1124/mol.105.017467
- Toker, A., & Dibble, C. C. (2018). PI 3-Kinase Signaling: AKTing up inside the Cell. *Molecular Cell*, 71(6), 875–876. doi:10.1016/j.molcel.2018.09.006
- Umemoto, Y., Patel, A., Huynh, T., & Chitravanshi, V. C. (2019). Wogonin attenuates the deleterious effects of traumatic brain injury in anesthetized Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*. doi:10.1016/j.ejphar.2019.01.035
- van Sloten, T. T. (2017). Vascular dysfunction: At the heart of cardiovascular disease, cognitive impairment and depressive symptoms. *Artery Research*, 19 (C), 18-23. doi.org/10.1016/j.artres.2017.05.002
- Vandiver, M., & Snyder, S. H. (2012). Hydrogen sulfide: a gasotransmitter of clinical relevance. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 90(3), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0873-4>
- 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. *Journal of Neurotrauma*, 34(1), 192–203. doi:10.1089/neu.2015.4340
- Villalba, N., Sonkusare, S. K., Longden, T. A., Tran, T. L., Sackheim, A. M., Nelson, M. T., ... Freeman, K. (2014). Traumatic Brain Injury Disrupts Cerebrovascular Tone Through Endothelial Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Nitric Oxide Gain of Function. *Journal of the American Heart Association*, 3(6), e001474–e001474. doi:10.1161/jaha.114.001474

Referencias

- Wallace, J. L., Motta, J.-P., & Buret, A. G. (2018). Hydrogen sulfide: an agent of stability at the microbiome-mucosa interface. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(2), G143–G149. doi:10.1152/ajpgi.00249.2017
- Wang J, Deng X, Xie Y, Tang J, Zhou Z, Yang F, He Q, Cao Q, Zhang L and He L (2021) An Integrated Transcriptome Analysis Reveals IGFBP7 Upregulation in Vasculature in Traumatic Brain Injury. *Front. Genet.* 11:599834. doi: 10.3389/fgene.2020.599834
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*, 16(13), 1792–1798. doi:10.1096/fj.02-0211hyp
- Wang, R. (2003). The Gasotransmitter Role of Hydrogen Sulfide. *Antioxidants & Redox Signaling*, 5(4), 493–501. doi:10.1089/152308603768295249
- Wen, Y.-D., Wang, H., & Zhu, Y.-Z. (2018). The Drug Developments of Hydrogen Sulfide on Cardiovascular Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–21. doi:10.1155/2018/4010395
- Wijayatilake, D. S., Sherren, P. B., & Jigajinni, S. V. (2015). Systemic complications of traumatic brain injury. *Current Opinion in Anaesthesiology*, 28(5), 525–531. doi:10.1097/aco.0000000000000236
- Wood, J. L. (1987). Sulfane sulfur. *Sulfur and Sulfur Amino Acids*, 25–29. doi:10.1016/0076-6879(87)43009-7
- Wu, W., Hou, C.-L., Mu, X.-P., Sun, C., Zhu, Y.-C., Wang, M.-J., & Lv, Q.-Z. (2017). H₂S Donor NaHS Changes the Production of Endogenous H₂S and NO in D-Galactose-Induced Accelerated Ageing. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–14. doi:10.1155/2017/5707830
- Xu, K., Wu, F., Xu, K., Li, Z., Wei, X., Lu, Q., ... 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. *Chemico-Biological Interactions*, 286, 96–105. doi:10.1016/j.cbi.2018.02.028
- Yanagawa, T., Bunn, F., Roberts, I., Wentz, R., & Pierro, A. (2002). Nutritional support for head-injured patients. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.cd001530

Referencias

- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., ... Wang, R. (2008). H₂S as a Physiologic Vasorelaxant: Hypertension in Mice with Deletion of Cystathionine - Lyase. *Science*, 322(5901), 587–590. doi:10.1126/science.1162667
- Yang, T., Song, J., Bu, X., Wang, C., Wu, J., Cai, J., ... Wang, J. (2016). Elevated serum miR-93, miR-191, and miR-499 are noninvasive biomarkers for the presence and progression of traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 137(1), 122–129. doi:10.1111/jnc.13534
- Yang, Y., Dewald, J. P. A., van der Helm, F. C. T., & Schouten, A. C. (2017). Unveiling neural coupling within the sensorimotor system: directionality and nonlinearity. *European Journal of Neuroscience*. doi:10.1111/ejn.13692
- Yang, Y.-M., Huang, A., Kaley, G., & Sun, D. (2009). eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 297(5), H1829–H1836. doi:10.1152/ajpheart.00230.200
- Yokoyama, M., & Hirata, K. (2007). Endothelial nitric oxide synthase uncoupling: Is it a physiological mechanism of endothelium-dependent relaxation in cerebral artery? *Cardiovascular Research*, 73(1), 8–9. doi:10.1016/j.cardiores.2006.1
- Yoo, D., Jupiter, R. C., Pankey, E. A., Reddy, V. G., Edward, J. A., Swan, K. W., ... Kadowitz, P. J. (2015). Analysis of cardiovascular responses to the H₂S donors Na₂S and NaHS in the rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 309(4), H605–H614. doi:10.1152/ajpheart.00171.2015
- Yu, X.-H., Cui, L.-B., Wu, K., Zheng, X.-L., Cayabyab, F. S., Chen, Z.-W., & Tang, C.-K. (2014). Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clinica Chimica Acta*, 437, 78–87. doi:10.1016/j.cca.2014.07.012
- Zaorska, E., Tomasova, L., Koszelewski, D., Ostaszewski, R., & Ufnal, M. (2020). Hydrogen Sulfide in Pharmacotherapy, Beyond the Hydrogen Sulfide-Donors. *Biomolecules*, 10(2), 323. doi:10.3390/biom10020323
- 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*. 23;9(1):e87241. doi: 10.1371/journal.pone.0087241. PMID: 24466346; PMCID: PMC3900713.

Referencias

- Zhang, D., Du, J., Tang, C., Huang, Y., & Jin, H. (2017). H₂S-Induced Sulfhydration: Biological Function and Detection Methodology. *Frontiers in Pharmacology*, 8. doi:10.3389/fphar.2017.00608
- Zhang, M., Shan, H., Chang, P., Ma, L., Chu, Y., Shen, X., ... Tao, L. (2017). Upregulation of 3-MST Relates to Neuronal Autophagy After Traumatic Brain Injury in Mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(2), 291–302. doi:10.1007/s10571-016-0369-9
- Zhang, M., Shan, H., Wang, T., Liu, W., Wang, Y., Wang, L., ... Tao, L. (2013). Dynamic Change of Hydrogen Sulfide After Traumatic Brain Injury and its Effect in Mice. *Neurochemical Research*, 38(4), 714–725. doi:10.1007/s11064-013-0969-4
- Zhao, W. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *The EMBO Journal*, 20(21), 6008–6016. doi:10.1093/emboj/20.21.6008
- Zhou, J., Lv, X.-H., Fan, J.-J., Dang, L.-Y., Dong, K., Gao, B., ... Wu, W.-N. (2018). GYY4137 Promotes Mice Feeding Behavior via Arcuate Nucleus Sulfur-Sulfhydration and AMPK Activation. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- Zhou, J., Lv, X.-H., Fan, J.-J., Dang, L.-Y., Dong, K., Gao, B., ... Wu, W.-N. (2018). GYY4137 Promotes Mice Feeding Behavior via Arcuate Nucleus Sulfur-Sulfhydration and AMPK Activation. *Frontiers in Pharmacology*, 9. doi:10.3389/fphar.2018.00966
- Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, Tan CS, Whiteman M, Lu J, Moore PK. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J Appl Physiol* (1985). 2007 Jan;102(1):261-8. doi: 10.1152/jappphysiol.00096.2006. Epub 2006 Oct 12. PMID: 17038495.
- 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*. *Critical Care Medicine*, 33(3), 654–660. doi:10.1097/01.ccm.0000155911.018

11. Anexos

11.1. Congresos

IV Congreso de Internacional de Neurobiología. Sociedad Mexicana de Bioquímica. Oaxaca, México. 2022. Presentación de póster.



Simposio latinoamericano “COVID-19 y cerebro”- LATBrain. Simposio virtual. 2021.



11.2. Cursos

“Principios de cirugía en roedores de laboratorio” UNAM. Curso virtual. 2 horas. 2021



11.3. Actividades académicas

Presentación de cartel y organización de la semana del cerebro 2022. Cinvestav-Sede sur. Evento virtual.

