

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

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Efecto del H₂S en la excitabilidad intrínseca de
células piramidales de la región CA1 del hipocampo
de rata”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. AMAYRANI PEREZ BARRAGAN

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS EN

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de la Tesis:

**Dr. David Centurión Pacheco
Dr. Emilio Javier Galván Espinosa**

Ciudad de México

Septiembre, 2024

El presente trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. David Centurión Pacheco en el laboratorio 6 del Departamento de Farmacobiología y en colaboración con el Dr. Emilio Galván Espinosa en el laboratorio 5 del Centro de Investigaciones sobre el Envejecimiento, ambos departamentos pertenecientes al Centro de Investigación y Estudios Avanzados. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología a través de la beca de maestría No. 823512.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Hipocampo	3
1.2. Neuronas piramidales de CA1.....	4
1.3. Excitabilidad intrínseca	6
1.4. Sulfuro de hidrógeno	6
1.4.1. Síntesis endógena del H₂S	8
1.4.2. Persulfuración de proteínas	10
1.4.3. Metabolismo del H₂S	10
1.4.4. Efectos biológicos y farmacológicos del H₂S	10
1.4.6. Ácido aminooxiacético (AOAA)	15
1.4.7. Efectos electrofisiológicos del H₂S.....	16
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo general	22
4.2. Objetivos específicos.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1. Fármacos.....	23
5.2. Animales.....	23
5.3. Diseño experimental	23
5.4. Obtención de rebanadas de cerebro	24
5.5. Registros electrofisiológicos en Patch Clamp	25

5.6. Determinación de propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales de CA1.....	25
5.7. Detección de las enzimas CBS, CSE y 3-MST en el área CA1 hipocampal a través de la técnica Western blot	27
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	29
7. RESULTADOS.....	29
7.1. La perfusión de NaHS a 200 μ M disminuye la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo	29
7.2. Expresión de enzimas relacionadas a la síntesis endógena de H ₂ S.....	38
7.3. Curva concentración-respuesta.....	39
7.4. La inhibición de la síntesis endógena de H ₂ S con AOAA aumenta la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.....	40
8. DISCUSIÓN.....	45
9. CONCLUSIÓN.....	48
10. PERSPECTIVAS	48
11. REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA 1. CIRCUITO HIPOCAMPAL Y NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1</u>	<u>4</u>
<u>FIGURA 2. VÍA DE SÍNTESIS DEL H₂S</u>	<u>8</u>
<u>FIGURA 3. FUNCIÓN FISIOLÓGICA DEL H₂S</u>	<u>16</u>
<u>FIGURA 4. NAHS INHIBE KV2.1 Y AUMENTA EL DISPARO DE POTENCIALES DE ACCIÓN EN LAS NEURONAS HIPOCAMPALES DE RATA.....</u>	<u>17</u>
<u>FIGURA 5. EFECTOS DE NAHS SOBRE LAS CORRIENTES DE SODIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE (I_{Na}) Y LAS CORRIENTES DE POTASIO SALIENTES DE NEURONAS HIPOCAMPALES DE LA REGIÓN CA3 DURANTE LA PRIMER SEMANA DE DESARROLLO POSNATAL DE RATAS WISTAR.....</u>	<u>18</u>
<u>FIGURA 6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA REALIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT.....</u>	<u>28</u>
<u>FIGURA 7. EFECTOS DEL NAHS (DONADOR DE H₂S) A 200 μM SOBRE LAS PROPIEDADES PASIVAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO.....</u>	<u>30</u>
<u>FIGURA 8. EFECTOS DEL DONADOR DE H₂S (NAHS) A 200 μM SOBRE LAS PROPIEDADES ACTIVAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO.....</u>	<u>32</u>
<u>FIGURA 9. EFECTO DEL DONADOR DE H₂S (NAHS) A 200 μM SOBRE LOS PARÁMETROS QUE PERMITEN MEDIR LAS PROPIEDADES DE DISPARO DE UNA NEURONA PIRAMIDAL DE CA1 DEL HIPOCAMPO.....</u>	<u>33</u>
<u>FIGURA 10. EFECTO DEL DONADOR DE H₂S (NAHS) A 200 μM SOBRE LA CINÉTICA DE DECAIMIENTO DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO.....</u>	<u>35</u>
<u>FIGURA 11. EFECTO DEL DONADOR DE H₂S (NAHS) A 200 μM SOBRE LA FASE DE POST HIPERPOLARIZACIÓN.....</u>	<u>36</u>
<u>FIGURA 12. EFECTO DEL DONADOR DE H₂S (NAHS) A 200 μM SOBRE LAS CORRIENTES TOTALES MACROSCÓPICAS.....</u>	<u>37</u>

<u>FIGURA 13. EXPRESIÓN LOCAL DE LAS ENZIMAS CBS, CSE, 3MST EN EL ÁREA CA1 DEL HIPOCAMPO.....</u>	<u>38</u>
<u>FIGURA 14. CURVA DE PORCENTAJE DE INHIBICIÓN A CONCENTRACIONES DE 50, 100 Y 200 μM.....</u>	<u>39</u>
<u>FIGURA 15. EFECTOS DEL INHIBIDOR DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE H₂S (AOAA) SOBRE LAS PROPIEDADES PASIVAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO.....</u>	<u>40</u>
<u>FIGURA 16. EFECTOS DEL INHIBIDOR DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE H₂S (AOAA) SOBRE LAS PROPIEDADES ACTIVAS DE LAS NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO.....</u>	<u>42</u>
<u>FIGURA 17. EFECTO DE AOAA A 100 μM SOBRE LA CINÉTICA DE DECAIMIENTO DE NEURONAS PIRAMIDALES DE CA1 DEL HIPOCAMPO.....</u>	<u>43</u>
<u>FIGURA 18. EFECTO DE AOAA A 100 μM SOBRE LA FASE DE POST HIPERPOLARIZACIÓN.....</u>	<u>44</u>

ÍNDICE DE TABLAS

[TABLA 1. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MODULADAS POR H₂S 11](#)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

μL	microlitro
μM	micromolar
3-MST	3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa
AC	adenilato ciclase
ACSF	líquido cefalorraquídeo artificial
AHP	hiperpolarización post potencial de acción
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
AOAA	ácido aminoxiacético
CA	cuernos de Amón (regiones del hipocampo)
Ca^{2+}	calcio
CaCl_2	cloruro de calcio
CAT	cistationina-aminotransferasa
CBS	cistationina- β -sintetasa
CO	monóxido de carbono
CSE	cistationina- γ -liasa
DG	giro dentado
DL-PAG	DL-propargilglicina
EGTA	ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N'N'-tetraacético
EPSC	corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas
fAHP	post hiperpolarización rápida
Gc	guanilato ciclase
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
GTP	trifosfato de guanosina
H^+	ión hidrógeno
H_2S	sulfuro de hidrógeno
HS^-	bisulfuro
I	corriente
i.p.	intraperitoneal
I-V	corriente-voltaje
K^+	potasio
K_{ATP}	potasio dependiente de adenosín trifosfato
KCl	cloruro de potasio
kg	kilogramo
K_v	potasio dependiente de voltaje
LTP	potenciación a largo plazo
MAPK	quinasas activadas por mitógenos
mf	fibras musgosas
mM	miliMolar
mV	milivolt

MΩ	mega Ohm
Na ⁺	sodio
Na ₂ HPO ₄	fosfato disódico
Na ₂ S	sulfuro de sodio
Na ₂ S ₂ O ₃	tiosulfato de sodio
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
NaHS	sulfhidrato de sodio
NF-kB	factor nuclear kappa B
nM	nanoMolar
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NO	óxido nítrico
O ₂	oxígeno
p66Shc	proteína transformante C1 que contiene dominio de homología 2 de Src
PA	potencial de acción
pA	picoamperios
PKA	proteína quinasa A
PKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PLP	piridoxal-5-fosfato
PMR	potencial de membrana en reposo
pp	vía perforante
PVDF	fluoruro de polivinilideno
RE	retículo endoplásmico
Sc	colaterales de Schaffer
SL-M	estrato lacunosum-moleculare
SNC	sistema nervioso central
SO	estrato oriens
SP	estrato piramidal
SR	estrato radiatum
T	constante de tiempo

Resumen

El sulfuro de hidrógeno (H_2S), un gas venenoso conocido por su toxicidad ha sido recientemente reconocido como una molécula beneficiosa con efectos positivos en varios sistemas fisiológicos, incluido el sistema nervioso central. Este estudio investigó el papel del H_2S en la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales CA1 del hipocampo, una región mesolímbica con un papel crítico en el aprendizaje y la memoria.

Para entender el rol del H_2S , se realizaron registros de patch-clamp en rebanadas frescas de hipocampo. La perfusión de ácido aminooxiacético, un inhibidor no específico de las enzimas CBS, CSE y 3-MST que son responsables de la síntesis de H_2S , provocó un efecto estimulante en la excitabilidad neuronal. Este efecto se manifestó como un aumento de la frecuencia de disparo de potenciales de acción y amplificación de la fase de hiperpolarización del potencial de acción. Estos cambios indican una mayor actividad neuronal y sugieren que las neuronas piramidales del hipocampo sintetizan y liberan H_2S localmente. Lo cual fue comprobado a través de la técnica de Western blot.

En una serie posterior de experimentos, el efecto de dosis crecientes de H_2S reveló una modulación neuronal compleja por H_2S exógeno. El H_2S suprimió la excitabilidad neuronal al producir la reducción de la frecuencia de disparo debido a una regulación negativa de la excitabilidad neuronal intrínseca, acompañado por un aumento en la duración del umbral de tiempo del potencial de acción, la disminución de la fase de hiperpolarización postpotencial de acción y la reducción de corrientes macroscópicas entrantes (posibles corrientes de sodio) y salientes (corrientes de potasio).

Estos hallazgos sugieren que un aumento local de H_2S modifica las propiedades activas de las neuronas piramidales de CA1. Este estudio proporciona información sobre el papel del H_2S en la salud neuronal, sugiriendo que podría existir un mecanismo neuroprotector más allá de la simple neutralización de especies reactivas de oxígeno, mediante la regulación de los canales iónicos y los potenciales de acción.

Abstract

Hydrogen sulfide (H₂S), a poisonous gas known for its toxicity, has recently been recognized as a beneficial molecule with positive effects on several physiological systems, including the central nervous system. This study investigates the role of H₂S in the intrinsic excitability of CA1 pyramidal neurons in the hippocampus, a key region involved in learning and memory.

To better understand this role, patch-clamp recordings were performed on hippocampal slices. Perfusion with aminooxyacetic acid, a non-specific inhibitor of the enzymes responsible for H₂S synthesis (CBS, CSE, and 3-MST), caused a stimulating effect on neuronal excitability. This effect was manifested as an increase in firing frequency and amplification of the post-action potential hyperpolarization phase. These changes indicate increased neuronal activity and suggest that hippocampal pyramidal neurons locally synthesize and release H₂S, which was confirmed through western blot analysis.

In a subsequent series of experiments, the effect of increasing doses of exogenous H₂S revealed a complex neuronal excitability by reducing firing frequency through a negative regulation of intrinsic neuronal excitability, increasing the excitability threshold, decreasing the post-action potential hyperpolarization phase, and reducing inward and outward currents.

Collectively, these findings indicate that a local surge of H₂S modifies the active properties of CA1 pyramidal neurons. This study provides crucial insights into the role of H₂S in neuronal health, suggesting that there may be a neuroprotective mechanism beyond the simple neutralization of reactive oxygen species, through the regulation of ion channels and action potentials.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.Hipocampo

La formación hipocampal es una región del sistema límbico que juega un papel fundamental en la memoria y el aprendizaje; está formada por diversas regiones que incluyen el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho, subículo, presubículo, parasubículo, y corteza entorrinal.

En cuanto a su conectividad, existen subcircuitos y mecanismos de comunicación alternativos. Sin embargo, acotándonos al circuito trisináptico, la principal entrada es a través de las neuronas de la corteza entorrinal que envían sus proyecciones hacia las células granulares del giro dentado, de ahí sus axones se proyectan hacia la región CA3, finalmente las neuronas de CA3 envían sus axones, denominados colaterales de Schaffer, hasta las neuronas piramidales de la región CA1. Por último, los axones de las neuronas piramidales de CA1 constituyen la salida de información del hipocampo que regresa a subículo y corteza entorrinal.

El hipocampo se localiza en el lóbulo temporal medial de los mamíferos, su forma es semejante a la letra “C” y protruye hacia el cuerno inferior del ventrículo lateral. Se divide en regiones: CA3, CA2 y CA1 y se encuentra laminado en 5 a 6 capas ordenadas también llamados *strata*.

En el área CA1 la principal capa celular es la de células piramidales como la que se representa en la figura 1. Esta capa es conocida como *stratum pyramidale* (figura 1 SP). Justo debajo de esta capa encontramos el *stratum oriens* (figura 1 SO), que contiene las dendritas basales de las células piramidales y también alberga varias clases de interneuronas de disparo rápido. Estas interneuronas cumplen funciones importantes en la regulación de la excitabilidad neuronal y la plasticidad sináptica. El *stratum radiatum* (figura 1 SR) se encuentra por encima de la capa de células piramidales y es donde se localiza una conexión sináptica relevante, la que se realiza desde los axones de las células de CA3 con las células de CA1, conocida como las colaterales de Schaffer (figura 1 sc). Esta conexión desempeña un papel esencial en la integración de la información y la formación de memoria y el aprendizaje de larga duración (Green, 1964). Finalmente, la capa más superficial de la región CA1 es el *stratum lacunosum-moleculare* (figura 1 SL-M), una región donde hacen sinapsis las fibras que provienen de la corteza entorrinal, a

través de la vía temporo-armónica, una región del cerebro involucrada en la percepción espacial y la navegación. Además, neuronas de otras áreas cerebrales como el núcleo reuniens del tálamo también envían sus proyecciones sinápticas a esta capa superficial. En conjunto, estas conexiones proporcionan una importante entrada de información somatosensorial, que participa de manera fundamental en los procesos de formación y consolidación de la memoria (Amaral y Witter, 1989).

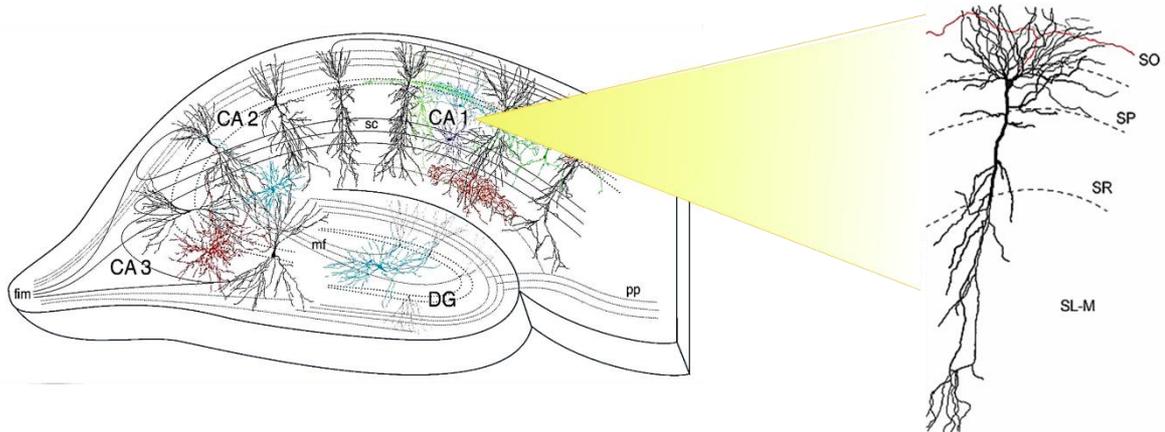


Figura 1. Circuito hipocampal y neuronas piramidales de CA1.

Esquema de una rebanada transversal de hipocampo que muestra los principales componentes del circuito hipocampal. DG (giro dentado), mf (fibras musgosas), CA3, CA2, sc (colaterales de Schaffer), CA1 y pp (vía perforante).

También se muestra de forma aumentada una neurona piramidal de CA1 reconstruida donde se permite observar a los distintos estratos de CA1.

SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SR, estrato radiatum; SL-M, estrato lacunosum moleculare.

Esquema extraído de Stanford.edu.; reconstrucción de neurona extraída de Griego, 2022.

1.2. Neuronas piramidales de CA1

Las células piramidales se caracterizan por su forma triangular con un soma grande. Su organización dendrítica es notablemente homogénea, a diferencia de las células piramidales del área CA3, que exhiben mayor heterogeneidad. A pesar de la homogeneidad de CA1, las células no son idénticas funcionalmente, ya que reciben entradas sinápticas disimiles desde la corteza entorrinal y diferentes ubicaciones a lo largo

del eje transversal de CA1; esto implica que hay diferentes circuitos y conexiones sinápticas en diferentes regiones de CA1, lo que puede tener consecuencias significativas para la función y la plasticidad sináptica de esta región.

El axón de las neuronas piramidales de CA1, es una sola fibra que emana del soma y proyecta a lo largo del *estratum oriens* y el alveus. Éste se arboriza y forma colaterales que contactan dentro y fuera del hipocampo, siendo el blanco más relevante el subículo. (Amaral y Witter, 1989).

El área CA1 desempeña una función crucial al convertir la información de la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo, promoviendo así el proceso de aprendizaje. Además, desempeña un papel fundamental en la memoria contextual y espacial, permitiendo recordar detalles de experiencias pasadas y mantener la orientación en el espacio. Sin embargo, debido a su alta susceptibilidad a hipoxia y anoxia, el área CA1 es particularmente vulnerable a daños celulares.

Además, la vulnerabilidad intrínseca de estas células ha conducido a investigaciones intensivas en el ámbito de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la demencia senil y la enfermedad de Huntington, pues se busca comprender los posibles mecanismos de neuroprotección y posibles tratamientos.

La excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de la región CA1 está formada por una gran variedad de conductancias iónicas sensibles a voltaje y/o calcio. Las células piramidales tienen una gran variedad de canales iónicos. Por ejemplo, los canales de potasio que se activan a potenciales supraumbrales dependientes de calcio (BK, SK, entre otras), las cuales contribuyen a la hiperpolarización postpotencial (Gu et al., 2007); o corrientes que se activan a potenciales subumbrales (IA e ID), estas últimas modulan la frecuencia de disparo (Storm, 1990; Johnston et al., 2000; Griego et al., 2022).

1.3.Excitabilidad intrínseca

La excitabilidad intrínseca es la predisposición o serie de características influyentes de una neurona para responder a estímulos eléctricos o químicos con la generación de potenciales de acción (PA), como consecuencia de la actividad dinámica de los canales iónicos que se encuentran en la membrana celular, junto con las propiedades cinéticas y bioquímicas vinculadas a esos canales (Llinás, 2014; Schulz, 2006).

El PA describe la sucesión de variaciones en el voltaje en la membrana celular y son considerados eventos de carácter "todo o nada"; una vez que se alcanza el umbral de disparo, procede una modificación rápida y completa en el potencial de membrana de la célula. Por consiguiente, el PA constituye un medio esencial para la transmisión de información entre neuronas (Kulbacka et al., 2017).

La excitabilidad intrínseca se divide en propiedades pasivas y activas. Las propiedades pasivas están relacionadas con las características eléctricas en reposo de la membrana celular, mientras que las propiedades activas están asociadas con los eventos que ocurren cuando la neurona se activa en respuesta a un estímulo para generar un PA (Kulbacka et al., 2017).

La relación entre las entradas y las salidas de un circuito neuronal, como el que constituye el hipocampo, depende tanto de la conectividad sináptica del circuito, como de la excitabilidad intrínseca de cada una de las neuronas que lo componen (Daoudal & Debanne, 2003). Esta relación está determinada por un conjunto de propiedades intrínsecas, que incluyen el potencial de reposo, la resistencia y la capacitancia de la membrana, así como las propiedades y distribución de los canales iónicos expresados en la membrana plasmática (Mozzachiodi & Byrne, 2010).

1.4.Sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un gas que se conoce desde el siglo XVII, principalmente por sus propiedades tóxicas. Efectivamente, este gas, a concentraciones de 500 a 1000 ppm, puede conducir a la muerte (Reiffenstein *et al.*, 1992). A pesar de ello, a través de estudios toxicológicos, el H₂S se encontró en el cerebro de seres humanos o animales que

no habían sufrido intoxicación por H₂S (Goodwin et al., 1989; Warenycia et al., 1989.) Es decir, el H₂S se sintetiza endógena y enzimáticamente en el cerebro a concentraciones micromolares de 40 a 200 μM y se encuentra de forma natural en las células.

El trabajo seminal de Abe y Kimura demostró que el H₂S es producido endógenamente y es capaz de modular la neurotransmisión en el hipocampo. (Abe et al., 1996). Así en 2002, se propuso que el H₂S formara parte de la familia de los gasotransmisores, donde ya se incluían el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO) (Mustafa et al., 2009; Wang, 2002, 2003). La inclusión del H₂S en esta familia se basó en su capacidad para cumplir con las características distintivas de los gasotransmisores que se enlistan a continuación: (Wang, 2002, 2014)

- Es una molécula gaseosa pequeña que una vez producida es parcialmente disuelto en su forma libre o parcialmente disociado.
- Permea libremente a través de las membranas plasmáticas.
- Se produce en las células de los mamíferos mediante procesos enzimáticos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.
- Desempeña funciones específicas y bien definidas a concentraciones fisiológicas relevantes.
- Sus efectos se han estudiado de manera extensa y concreta en el sistema cardiovascular, el sistema nervioso, el sistema respiratorio, el sistema gastrointestinal, entre otros.
- Las modificaciones de sus niveles endógenos se correlacionan con cambios funcionales en diferentes sistemas.
- La administración de donadores exógenos, para investigar su función, provoca efectos similares a los del H₂S producidos de manera endógena.

1.4.1. Síntesis endógena del H₂S

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) no puede almacenarse en vesículas por su naturaleza gaseosa. Por lo tanto, es producido localmente y también se libera de reservas endógenas; es sintetizado a partir del aminoácido L-Cisteína por medio de tres vías enzimáticas, como lo representa la figura 2, donde participan las enzimas: (1) cistationina-β-sintasa (figura 2 CBS), (2) cistationina-γ-liasa (figura 2 CSE) y (3) 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (figura 2 3-MST) en conjunto con la cistationina-aminotransferasa (figura 2 CAT) (Wang 2012). La cantidad específica de H₂S producida puede variar dependiendo del tejido y la especie en cuestión (Abe et al., 1996).

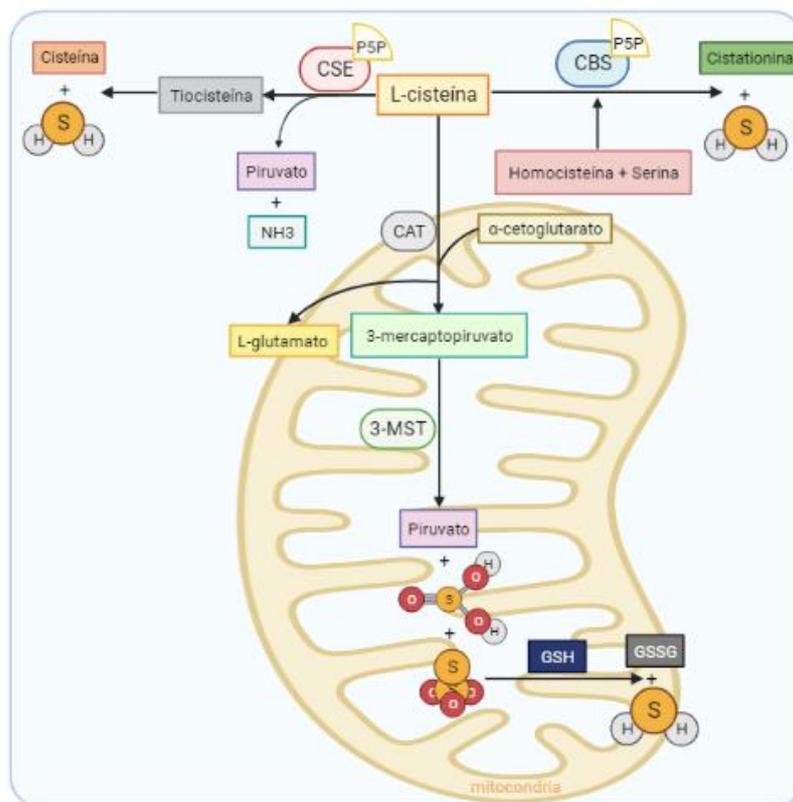


Figura 2. Vía de síntesis del H₂S. El sulfuro de hidrógeno (H₂S) se produce a partir del sustrato L-cisteína. La enzima Cistationina-β-sintasa (CBS) se asocia con la formación de cistationina y la producción de H₂S mediante la condensación de homocisteína con L-cisteína. Por otro lado, la enzima Cistationina-γ-liasa (CSE) cataliza la transformación de L-cisteína en piruvato, amonio y tiocisteína; esta última se descompone en cisteína y H₂S. Además, la enzima Cisteína-aminotransferasa (CAT) desencadena la liberación de 3-mercaptopiruvato y L-glutamato al catalizar la reacción entre L-cisteína y α-

cetoglutarato. La enzima 3-mercaptopiruvato-sulfurtransferasa (3-MST) cataliza la reacción de 3-mercaptopiruvato, que produce ácido sulfuroso, piruvato y tiosulfato. El tiosulfato es reducido a H₂S y glutatión disulfuro con ayuda del glutatión reducido.

CSE, Cistationina-β-sintasa; CBS, Cistationina-γ-liasa; CAT, Cisteína-aminotransferasa; 3-MST, 3-mercaptopiruvato-sulfur-transferasa. Figura creada con Biorender.com

Además, los niveles de H₂S en la sangre también depende de bacterias específicas en el intestino que son capaces de producirlo. Estas bacterias, conocidas como bacterias sulfato-reductoras, generan H₂S al metabolizar la glucosa, polisulfuros y aminoácidos que contienen azufre (Searcy, 1998). Así mismo, los eritrocitos también pueden producir H₂S al convertir el azufre elemental en HS⁻ mediante un proceso de reducción no enzimática. Estos mecanismos adicionales de producción contribuyen a mantener los niveles adecuados de H₂S en el organismo y desempeñan un papel importante en diversas funciones biológicas.

La cistationina-β-sintetasa (CBS) es una enzima presente en el citosol que utiliza piridoxal-5-fosfato como cofactor y cataliza la condensación entre la L-Cisteína y la homocisteína produciendo cistationina y H₂S. (Chen *et al.*, 2004). La CBS se expresa en diversos tejidos como el hígado, el riñón, el páncreas, el íleon y el cerebro (Kimura, 2018), especialmente en astrocitos (Enokido *et al.*, 2005; Ichinohe *et al.*, 2005) y microglía. (Hu *et al.*, 2007)

La cistationina-γ-liasa (CSE) es otra enzima citosólica que también requiere piridoxal-5-fosfato como cofactor. CSE convierte la L-Cisteína en piruvato, tiocisteína y amonio, liberando H₂S en el proceso (Chiku *et al.*, 2009). Se encuentra en varios órganos, como el hígado, el riñón, la aorta, el íleon, la vena porta, el corazón y en menor medida en el tejido cerebral. (Fu *et al.*, 2012; Kimura, 2014; Paul *et al.*, 2014).

La tercera vía enzimática involucra tanto a la enzima 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST) como a la enzima cisteína-aminotransferasa (CAT). La 3-MST se localiza tanto en el citosol como en la mitocondria, y no requiere piridoxal-5-fosfato como cofactor. En esta vía, la enzima CAT convierte L-Cisteína en 3-mercaptopiruvato y α-cetoglutarato, y luego, la 3-MST permite la conversión de 3-mercaptopiruvato a piruvato y H₂S (Shibuya *et al.*, 2009). La enzima 3-MST se expresa principalmente en el endotelio vascular y en el cerebro, específicamente en las neuronas. (Figura 2).

1.4.2. Persulfuración de proteínas

Una vez sintetizado, el H₂S regula diversas vías de señalización intracelular, así como la actividad de diferentes canales iónicos y diversas enzimas mediante un mecanismo de persulfuración de proteínas (Paul & Snyder, 2015). Este proceso, similar a la nitrosilación, involucra la interacción del H₂S con residuos de cisteína oxidados. La persulfuración puede ocurrir de tres maneras: (1) a través del ataque nucleofílico del sulfuro a un residuo de cisteína oxidado, (2) mediante la reacción entre una especie de sulfuro oxidada y el grupo tiol de la cisteína, o (3) mediante la reacción del disulfuro de hidrógeno (H₂S₂) con el grupo tiol de la cisteína (Paul & Snyder, 2015a, 2015b). Al igual que la nitrosilación, la persulfuración puede ser revertida enzimáticamente por las enzimas tioredoxina y tioredoxina reductasa (Krishnan et al., 2011).

1.4.3. Metabolismo del H₂S

El H₂S se metaboliza principalmente por tres vías para mantener sus niveles bajos y prevenir sus efectos tóxicos. La primera vía ocurre en la mitocondria, donde el H₂S se convierte en tiosulfato, luego en sulfito y posteriormente se elimina como sulfato, el principal producto final del metabolismo del H₂S (Kimura, 2012). La concentración de tiosulfato en la orina es un marcador de la síntesis de H₂S en el cuerpo. La segunda vía involucra la enzima tiol-S-metiltransferasa, que convierte el H₂S en dimetilsulfuro. La tercera vía implica la reacción del H₂S con la hemoglobina, formando sulfohemoglobina (Kimura, 2012).

1.4.4. Efectos biológicos y farmacológicos del H₂S

El sulfuro de hidrógeno se produce prácticamente en todas las células del organismo. Por esta razón se han reportado diversos efectos fisiológicos en el sistema cardiovascular (Wang, 2012), el sistema nervioso (Lu, et al. 2012), sistema endócrino (Tang, et al. 2013), sistema inmune (Dilek, et al. 2020), sistema reproductivo (Zuo, et al. 2014), sistema gastrointestinal (Gil, et al. 2013), el hígado (Fujii, et al. 2005), riñón (Tripatara, et al. 2008), sistema urinario (Yamamoto, et al. 2013), entre otros (Cirino et al., 2023). El H₂S ha surgido como un mediador con diversas propiedades, entre ellas antioxidantes,

antiinflamatorias y neuroprotectoras. A concentraciones bajas el H₂S se ha destacado por su potencial en el envejecimiento y como agente farmacológico para tratar enfermedades neurodegenerativas a través del diseño de nuevos donantes ya que, para señalizar, el H₂S produce modificaciones postraduccionales de los residuos de cisteína por sulfhidratación o persulfidación, evento que se puede comparar con la fosforilación porque media varias vías de señalización como las mencionadas en la Tabla 1. (Sestito, 2019; Tripathi et al, 2023).

Aunque al H₂S se le considera un gas tóxico se ha demostrado que tiene efectos beneficiosos, como la regulación de la presión arterial y la protección contra el daño celular. Así mismo se ha demostrado que el H₂S modifica la liberación de neurotransmisores, y la actividad de las neuronas (Kimura, 2007).

Tabla 1. Vías de señalización moduladas por H₂S.

Vía de señalización	Papel del H ₂ S	Resultados	Referencia
Guanilato ciclasa y GMPc	Activa guanilato ciclasa (enzima que convierte GTP en GMPc). GMPc actúa como 2do mensajero.	Relajación de músculos vasculares, regulación de función cardiovascular	Whiteman et al., 2011
Óxido nítrico y GMPc	Ambos gases NO y H ₂ S activan guanilato ciclasa aumentando la producción de GMPc	Protección contra estrés oxidativo	Pan et al., 2012

<p>Canales de Ca²⁺ y K⁺</p>	<p>Abre canales de K_{ATP} y produce hiperpolarización membranar</p> <p>Inhibe canales de Cav3.2, disminuyendo concentración intracelular</p>	<p>Inhibe excitabilidad neuronal</p>	<p>Zhao et al., 2001</p> <p>Elies et al., 2014</p>
<p>Factor nuclear kappa β (NF-kB)</p>	<p>Inhibe la activación del factor de transcripción NF-kB (involucrado en la regulación de la inflamación y la respuesta inmunitaria.)</p>	<p>Reduce la producción de citocinas proinflamatorias.</p>	<p>Kimura, 2018</p>
<p>Proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)</p>	<p>Activa la vía de las MAP quinasas (importantes en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia).</p>	<p>Regulación de la muerte celular</p>	<p>Polhemus & Lefer 2014</p>

<p>Sistema glutamatérgico, especialmente receptores NMDA (N-metil-D-aspartato)</p>	<p>Provoca aumento de glutatión al estimular la entrada de cistina en las células</p>	<p>Evita oxitosis (entrada masiva de calcio, especialmente a través de los canales de calcio tipo NMDA, que conducen a la liberación excesiva de glutamato lo que provoca excitación neuronal prolongada que puede ser tóxica y generar apoptosis).</p>	<p>Gadalla, et al., 2010</p>
---	---	---	------------------------------

La disminución de este gasotransmisor endógeno está relacionada con algunos trastornos neurodegenerativos (Tripathi et al., 2023); sin embargo, es importante destacar que la administración exógena de H₂S también puede tener efectos negativos en el cerebro, ya que se ha demostrado que su exposición prolongada a niveles elevados (concentraciones de 100 a 1000 ppm) puede ser tóxica para las células cerebrales y puede contribuir a la patogénesis de otras enfermedades neurológicas causando lesiones cerebrales agudas en tálamo, corteza, ganglios basales, y aunque los mecanismos exactos no están completamente caracterizados, los efectos neurotóxicos se asemejan a lesiones causadas por hipoxia isquémica o sustancias adictivas donde los mecanismos celulares y moleculares implicados incluyen estrés oxidativo, excitotoxicidad por glutamato y neuroinflamación (Xue Yang et al., 2019).

1.4.5. Herramientas farmacológicas empleadas para estudiar los efectos biológicos del sulfuro de hidrógeno

El H₂S es un gas incoloro, volátil, inflamable, soluble en agua y con olor característico. Para estudiar las respuestas fisiológicas al H₂S, existen diversas herramientas farmacológicas (Papapetropoulos, et al., 2015).

Por ejemplo, existen donadores de H₂S que están clasificadas como sales inorgánicas, compuestos orgánicos sintéticos y compuestos de origen natural (Szabo & Papapetropoulos, 2017). Dentro de los compuestos inorgánicos se encuentran las sales de sodio como el NaHS o el Na₂S y el Na₂S₂O₃. Estos compuestos han sido empleados extensamente en experimentos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, tienen algunas limitaciones como que al disolverse en agua las sales forman el H₂S de manera dependiente del pH. Además, en solución el H₂S se disocia en H⁺ y HS⁻. Así, en función de la constante de disociación se calcula que solamente el 20% de la solución acuosa está en forma de gas (H₂S), mientras que el 80% se encuentra en su forma disociada (HS⁻). Por esta razón, se utilizan concentraciones o dosis altas de estos donadores. Además, son donadores rápidos ya que, al entrar en contacto con el agua, reaccionan para generar H₂S rápidamente (Szabo & Papapetropoulos, 2017). Existe otro compuesto inorgánico denominado SG-1002, S8 o corona de azufre, producido por la compañía Sulfagenix®, el cual tiene propiedades cardioprotectoras importantes (Polhemus, et al., 2015).

En la literatura se han reportado varios donadores orgánicos sintéticos que incluyen al donador GYY4137. Este compuesto es un donador lento de H₂S (Whiteman, et al., 2006). De manera interesante, también se han reportado moléculas híbridas que contienen una molécula de un fármaco utilizado en la clínica junto con donador de H₂S. Uno de ellos es el ATB-346, el cual es una combinación del naproxeno y de un donador de H₂S con propiedades antiinflamatorias importantes (Szabo & Papapetropoulo, 2017).

En la naturaleza, existen muchas moléculas que donan el H₂S. Estas moléculas se encuentran principalmente en vegetales como el ajo, brócoli, cebolla, entre otros. El dialilsulfuro, dialildisulfuro, trialildisulfuro, S-alil-cisteína, S-propargil-L-cisteína, tioglicina, tiovalina o sulforafano son moléculas que se encuentran en estos vegetales y son donadores de H₂S (Szabo & Papapetropoulos, 2017).

También existen inhibidores de las enzimas productoras de H₂S, que incluyen: (1) inhibidores de la enzima CSE como la propargilglicina (EPSCPPG, DL-PAG), ácido aminooxicético (AOAA), beta-ciano-alanina y aminoetoxivinilglicina; (2) inhibidores de la CBS como el ácido aminooxicético (AOAA); (3) inhibidores de la 3-MST como alfa-cetobutirato, alfa-cetoglutarato y piruvato. Sin embargo, todos estos inhibidores carecen de selectividad lo que limita la interpretación de los resultados.

1.4.6. Ácido aminooxicético (AOAA)

El AOAA actúa como un inhibidor irreversible para enzimas dependientes de piridoxal 5-fosfato (PLP). Este compuesto se une de manera covalente al PLP en el sitio activo de la cistationina beta-sintasa (CBS), formando una base de Schiff (una imina), lo cual conduce a una inactivación irreversible de la enzima. Esta unión bloquea la capacidad de la CBS para catalizar la conversión de homocisteína y serina a cistationina y H₂S.

Además, el AOAA compite por el sitio activo de la cistationina gamma-liasa (CSE), ya que también utiliza PLP como cofactor. La unión de AOAA al PLP en el sitio activo de CSE impide la unión y procesamiento de su sustrato natural, cisteína, lo que resulta en la inhibición de la producción de H₂S. Esta interacción forma un complejo estable que obstaculiza la actividad catalítica de la enzima.

En cuanto a la enzima 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST), el AOAA no la inhibe directamente, sino que inhibe a la cisteína aminotransferasa (CAT), responsable de la producción del sustrato de 3-MST. La unión del AOAA al PLP en el sitio activo de CAT reduce la generación de 3-mercaptopiruvato, disminuyendo así la producción de H₂S por parte de 3-MST.

Además de estos efectos específicos, el AOAA puede inhibir otras aminotransferasas dependientes de PLP en la célula, lo que podría tener repercusiones adicionales en el metabolismo de aminoácidos y en la producción de H₂S. Esta inhibición generalizada de enzimas clave contribuye a una disminución global en la producción de H₂S y puede afectar diversas vías metabólicas. (Zuhra et al., 2020)

1.4.7. Efectos electrofisiológicos del H₂S

El sulfuro de hidrógeno tiene efectos complejos sobre diferentes tipos de canales iónicos, lo que puede tener diversas implicaciones en la función y protección de las células nerviosas y gliales. Se ha propuesto que el H₂S puede regular la función neuronal a través de la vía AMPc/PKA y la fosfolipasa C (PLC)/ proteína cinasa C (PKC), desencadenando la apertura de canales de Ca²⁺ tipo L y tipo T, activando los receptores NMDA y, facilitando la entrada de Ca²⁺ como se muestra en la figura 3 (Xue Yang, et al., 2019). También se ha relacionado con la modulación de canales de K_{ATP}, sugiriendo neuroprotección, ya que suprime la formación de ROS mitocondrial mediante su activación y la S-sulfhidratación de p66Shc (Kimura et al., 2006).

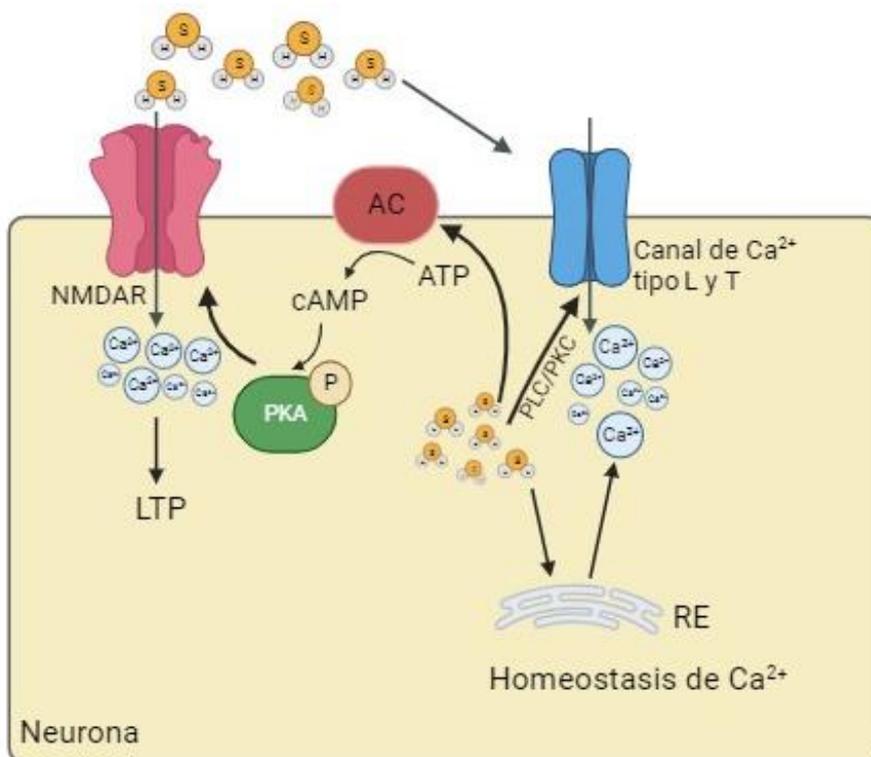


Figura 3. Función fisiológica del H₂S. El sulfuro de hidrógeno (H₂S) promueve la potenciación a largo plazo (LTP) a partir de la vía AMPc/PKA o actúa directamente sobre receptores NMDA promoviendo la entrada de Ca²⁺. Además, el H₂S activa los canales de Ca²⁺ tipo L y T a través de la vía PLC/PKC y actúa sobre el retículo endoplásmico (RE) regulando la homeostasis intracelular del Ca²⁺. Figura creada con Biorender.com

Asimismo, Dallas, et. al. 2021 reportaron que el donador NaHS a 200 μM , en cultivos de neuronas primarias hipocampales de rata Wistar, modula el canal de rectificación Kv2.1 por H_2S ; este canal está regulado mediante modificaciones postraduccionales que tienen profundas consecuencias funcionales en el SNC.

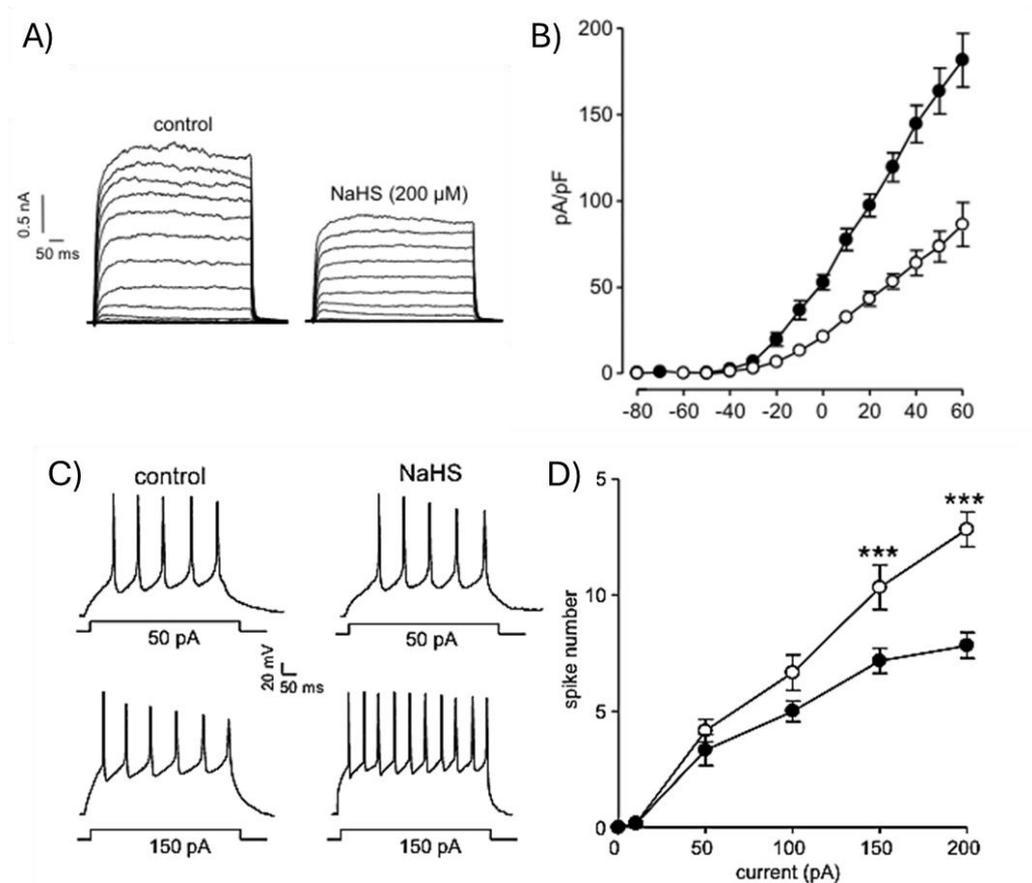


Figura 4. La NaHS inhibe al Kv2.1 y aumenta el disparo de potenciales de acción en las neuronas hipocampales de rata. **A)** Corrientes evocadas en una neurona del hipocampo de rata, antes y durante la exposición a NaHS (200 μM), mediante despolarizaciones aplicadas hasta 60 mV en incrementos de 10 mV desde un potencial de reposo de -70 mV. Las barras de escala se aplican a ambas familias de corrientes. **B)** Relación \pm s.e.m. de densidad de corriente frente a voltaje obtenida en 8 células antes (círculos sólidos) y durante (círculos abiertos) la exposición a NaHS (200 μM). **C)** Pulsos de voltaje evocados por inyecciones de corriente cuadrada despolarizante (trazos superiores 50 pA, trazos inferiores 150 pA) en neuronas del hipocampo perfundidas en

ausencia (trazos de la izquierda) o presencia (trazos de la derecha) de NaHS (200 μ M).

D) Número de potenciales de acción evocados \pm s.e.m. medidos en respuesta a inyecciones de corriente despolarizante de 500 ms de amplitud variable. Los potenciales de acción se midieron en ausencia (círculos sólidos) o presencia (círculos abiertos) de 200 μ M de NaHS. Figura modificada de Dallas et. al. 2021.

Otro de los reportes que se han mencionado en la literatura fue realizado con el donador NaHS a 100 μ M en neuronas piramidales de CA3, donde se observó una disminución de la frecuencia de disparo que fue significativa al 53% contra el control, y fue parcialmente reversible tras el lavado de 45 min (Yakovlev et. al. 2017).

Lo que sugiere que el H₂S bloquea canales de K⁺ facilitando una depolarización y al mismo tiempo suprime la actividad de canales de Na⁺. Al remover el NaHS, se abrieron los canales de K⁺ y la célula se hiperpolarizó.

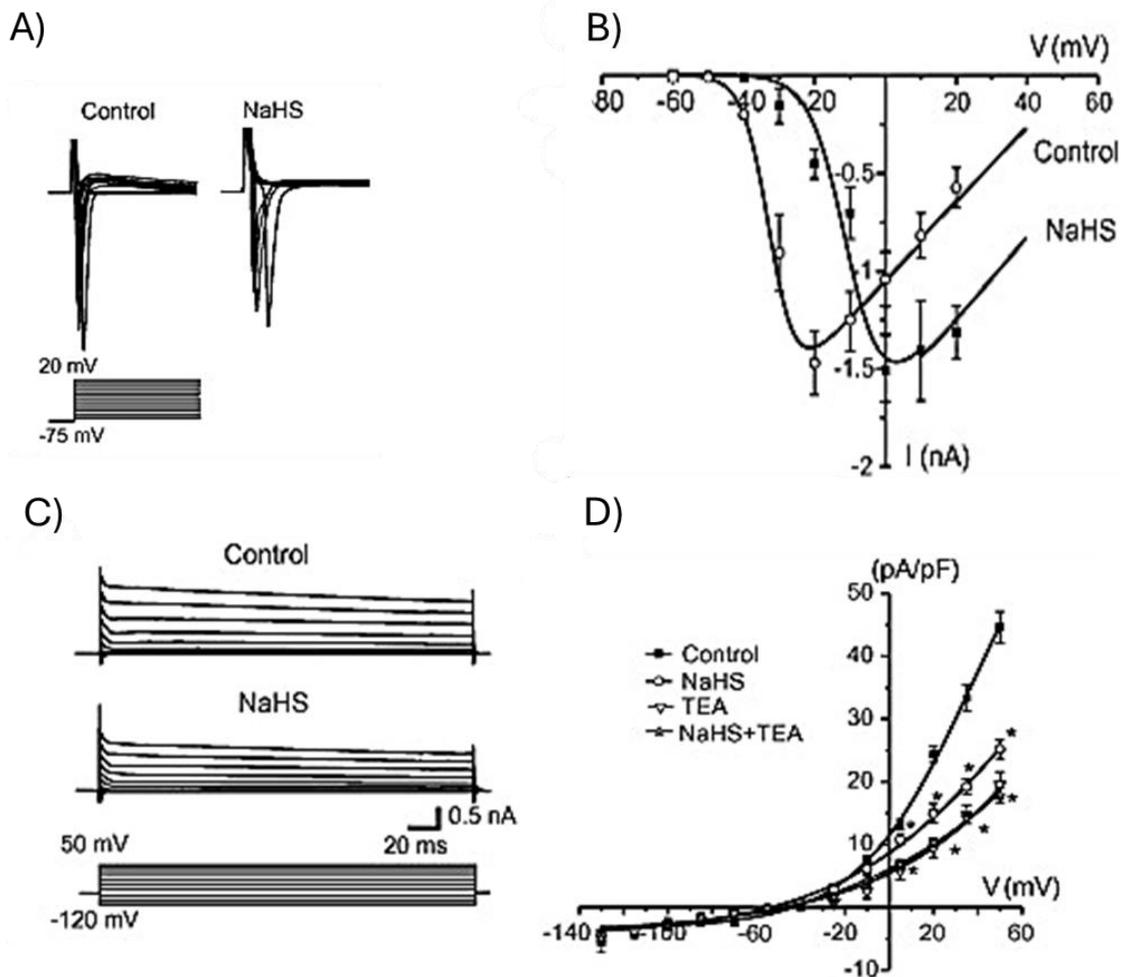


Figura 5. Efectos de NaHS sobre las corrientes de sodio dependientes de voltaje (I_{Na}) y las corrientes de potasio salientes de neuronas hipocampales de la región CA3 durante la primer semana de desarrollo posnatal de ratas Wistar.

A) I_{Na} provocada por el protocolo de activación que se muestra en la parte inferior en el control, después de la adición de NaHS (100 μ M). **B)** Curva $I-V$ de I_{Na} provocada por una serie de pulsos despolarizantes a partir de un potencial de mantenimiento de -75 mV en el control (círculos abiertos) y en presencia de 100 μ M de NaHS (cuadrados rellenos). Los datos se ajustaron con una función de Boltzmann modificada (línea continua a través de los puntos de datos). **C)** Corrientes de potasio evocadas durante una serie de pasos despolarizantes a partir de un potencial de mantenimiento de -70 mV en condiciones de control y en presencia de NaHS (100 μ M). **D)** Curvas $I-V$ de la corriente de K^+ realizados con la modalidad de whole cell de la técnica de patch-clamp que representan valores de densidad de corriente (pA/pF) en condiciones control (cuadrados rellenos), y después de la aplicación de NaHS (círculos abiertos). Figura modificada de Yakovlev, et. al. 2017.

Sin embargo, debido a que las evidencias antes mencionadas se han estudiado *in vitro* e *in vivo* (únicamente en células piramidales de CA3 en rata neonatal de 3 a 7 días), no han sido estudios concluyentes para proporcionar información valiosa sobre los mecanismos neuroprotectores y neuromoduladores para futuras estrategias terapéuticas para trastornos neurológicos relacionados o que puedan revertir la pérdida de la memoria.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Se sabe que el H₂S tiene efectos sobre el SNC y se ha demostrado que tiene propiedades anti-inflamatorias, profágicas, neuroprotectoras, neuromoduladoras y a dosis bajas es prometedor en el envejecimiento porque protege del daño que causa el estrés oxidativo (Sestito, 2019). Sin embargo, se requiere una caracterización del papel del H₂S tanto en la función neuronal normal como en la patogénesis de enfermedades neurológicas.

Dado que el sulfuro de hidrógeno modula la excitabilidad neuronal, estudiar sus efectos en una región bien caracterizada como es el área CA1 del hipocampo proporcionará información valiosa sobre cómo este gasotransmisor puede influir en la excitabilidad neuronal.

Investigar el papel específico en la excitabilidad intrínseca de neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo bajo el efecto de H₂S podría ayudar a proporcionar una perspectiva más amplia sobre la influencia del H₂S en la actividad eléctrica del hipocampo y, potencialmente, abrir nuevas vías de investigación en el campo de las neurociencias y el desarrollo de posibles terapias dirigidas a enfermedades neurológicas que involucren disminución de H₂S endógeno.

El presente proyecto se centra en estudiar los efectos del H₂S utilizando técnicas de registro electrofisiológico con el fin de analizar los cambios en la actividad eléctrica de las células en la región CA1 del hipocampo de ratas y su transmisión sináptica en presencia de H₂S para llenar ese vacío de conocimiento y proporcionar información valiosa sobre mecanismos neuroprotectores con el propósito de futuras estrategias terapéuticas para trastornos neurológicos relacionados y de la memoria.

Con este propósito, se utilizará la técnica de patch-clamp de célula completa, la cual nos proporcionará una visión más detallada de las propiedades eléctricas de las neuronas piramidales individuales, permitiéndonos analizar su excitabilidad neuronal y evaluar cómo responden a los estímulos en presencia del H₂S exógeno. Además, esta técnica permitirá analizar los efectos del H₂S a nivel celular y entender cómo esta molécula puede modular la actividad neuronal (Margrie et al., 2002). Lo que nos permitirá entender mejor el papel de esta molécula en el funcionamiento del cerebro y su potencial impacto a través de donadores farmacológicos en enfermedades neurológicas.

3. HIPÓTESIS

La exposición a NaHS, donador de H₂S, disminuirá la excitabilidad intrínseca neuronal en las células piramidales de la región CA1 del hipocampo. Por el contrario, la perfusión de ácido aminooxiacético, inhibidor de las enzimas endógenas que producen H₂S, aumentará la excitabilidad intrínseca.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto electrofisiológico del H₂S sobre las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo.

4.2. Objetivos específicos

- I) Evaluar los parámetros básicos de excitabilidad intrínseca de neuronas piramidales de CA1 en condiciones control y tras la exposición a NaHS.
- II) Demostrar la expresión de las enzimas que sintetizan H₂S endógeno (CBS, CSE, 3-MST) en el área CA1 del hipocampo.
- III) Determinar si la inhibición de las enzimas CBS, CSE y 3-MST con ácido aminooxiacético suprime el efecto del H₂S endógeno.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Fármacos

El NaHS, donador de H₂S, se obtuvo de *Sigma-Aldrich* y se disolvió en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF), a un pH de 7.4 y 25 °C. Para el tratamiento farmacológico con NaHS se prepararon soluciones nuevas todos los días.

El ácido aminooxiacético (AOAA), inhibidor de las enzimas CBS, CSE y CAT que se encargan de la producción de H₂S endógeno, se obtuvieron de *Sigma-Aldrich* y se disolvieron en ACSF.

5.2. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 4 a 5 semanas postnatal con un rango entre 100-150g de peso. Los animales fueron otorgados y mantenidos por el bioterio de la Sede Sur del Cinvestav; los animales estuvieron alojados en jaulas de plástico en un cuarto con temperatura y humedad controlada (18-26°C, 50% HR); con acceso a alimento y agua *ad libitum* y periodos de luz-oscuridad 12/12 h.

Los procedimientos en el presente proyecto de investigación fueron realizados bajo los lineamientos establecidos en la **NOM-062-ZOO-1999** y el **Comité de Bioética del CINVESTAV**.

También siguieron las pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) para el uso y cuidado de los animales.

5.3. Diseño experimental

Para determinar los parámetros básicos de excitabilidad intrínseca de células piramidales de CA1 control vs las tratadas con NaHS a diferentes concentraciones fisiológicas se utilizaron los siguientes grupos:

- Grupo control: Rebanada de hipocampo + ACSF (vehículo de NaHS)
- Grupo tratado con NaHS: La misma rebanada control de hipocampo se perfundió con NaHS a una concentración de 200 μM.

Con el fin de demostrar la expresión de las enzimas que sintetizan H₂S endógeno en el área CA1 del hipocampo se utilizaron:

- Rebanadas hipocampales control donde se extrajo específicamente el área CA1

Para determinar si la inhibición de las enzimas CBS, CSE y CAT suprimió el efecto del H₂S endógeno se utilizaron los siguientes grupos:

- Grupo control: Rebanada de hipocampo + ACSF (vehículo de NaHS).
- Grupo tratado: La misma rebanada control de hipocampo se perfundió con ácido aminooxiacético, un inhibidor de las enzimas CBS, CSE y CAT, a 100 μM.

5.4. Obtención de rebanadas de cerebro

Para obtener las rebanadas de cerebro, se procedió a anestesiarse a las ratas mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 60 mg/kg. Posteriormente, las ratas fueron decapitadas inmediatamente después de entrar en un estado de anestesia profunda. Con cuidado, se extrajo el encéfalo y se sumergió en una solución helada de sacarosa con una composición específica en [mM]: sacarosa 210, KCl 2.8, MgSO₄ 2, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, D-glucosa 10, MgCl₂ 1 y CaCl₂ 1.

Asimismo, con ayuda de un bisturí, los hemisferios cerebrales fueron separados y se fijaron en la plataforma de corte de un vibratomo (Leica VT1000 S). Mediante este equipo se obtuvieron rebanadas transversales de 370 micrómetros de grosor que incluían hipocampo. Dichas rebanadas se incubaron en una solución específica a 34°C durante 30 minutos y a temperatura ambiente durante una hora antes de realizar los registros electrofisiológicos. Esta solución contenía en [mM]: NaCl 125, KCl 2.5, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 4, D-glucosa 10 y CaCl₂ 1.

Para permanecer con las condiciones óptimas, tanto la solución de sacarosa como la de incubación se mantuvo continuamente carboxigenada (mezcla de 95% O₂/5% CO₂) durante todo el procedimiento, garantizando una adecuada saturación de oxígeno y un pH constante de 7.4. Esto aseguró la viabilidad de las rebanadas y la estabilidad de las condiciones para el posterior análisis electrofisiológico.

5.5. Registros electrofisiológicos en Patch Clamp

Después de la etapa de incubación, las rebanadas fueron sumergidas de tal manera que quedaron fijas en una cámara de registro donde se perfundió a una velocidad constante líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF), el cual tenía una composición específica en [mM]: NaCl 125, KCl 2.5, Na₂HPO₄ 1.25, NaHCO₃ 26, MgCl₂ 2, D-glucosa 10 y CaCl₂ 2, con la finalidad de mantener las condiciones adecuadas para las neuronas y así mismo estuvo bajo una mezcla de oxígeno y dióxido de carbono para asegurar una buena oxigenación y mantener un pH estable alrededor de 7.4.

Los registros electrofisiológicos fueron realizados a una temperatura de 32± 1°C.

Para observar y acceder a las neuronas se utilizó un microscopio con una cámara infrarroja de contraste de fase para visualizar las neuronas a través de un objetivo de inmersión 40x. Se emplearon pipetas de borosilicato estiradas con un estirador horizontal Flaming-Brown P-97 (Sutter Instrument Co.) para tener una punta fina, con una resistencia de 3-6 MΩ.

Para los registros de patch clamp, las pipetas de registro se llenaron con una solución intracelular que permitió medir la actividad eléctrica intracelular de las neuronas, cuya composición en [mM] fue: K⁺-MeSO₄ 135, KCl 10, NaCl 5, EGTA 1, HEPES 10, Mg²⁺-ATP 2, Na⁺-GTP 0.4, fosfocreatina 10, contando con un pH entre 7.2 a 7.3 y una osmolaridad ajustada a 300-315 mOsm. Estas pipetas fueron utilizadas para estudiar neuronas piramidales en la región CA1 del hipocampo. Se realizaron diferentes tipos de protocolos para evaluar la excitabilidad intrínseca de las neuronas y se mantuvo el potencial de membrana de las células a -65 mV.

Para la programación de protocolos de estimulación, adquisición de registros y análisis de los datos se utilizó el software pCLAMP 10.6 (Axon Instruments Inc. Foster City, CA, EE. UU.).

5.6. Determinación de propiedades intrínsecas de las neuronas piramidales de CA1

Primero se identificó la neurona y la micropipeta de vidrio se acercó a su membrana celular hasta crear una unión tan fuerte que no pudiera pasar carga entre ambas, es decir, se formó el gigasello en modalidad de fijación de voltaje (voltaje-clamp).

Posteriormente se aplicó una succión ligera para romper la membrana justo debajo de la boca de la pipeta, estableciendo una continuidad entre la solución intracelular y la solución de la pipeta. Se dejó estabilizar el sello por un par de minutos y se registró el potencial de membrana en reposo de la neurona (PMR).

Con la finalidad de registrar las propiedades neuronales, los siguientes parámetros en la modalidad de fijación de corriente (current clamp) fueron determinados:

Curva corriente/voltaje (I-V): Se inyectaron pulsos de corriente cuadrados comenzando desde -300 pA y aumentando con incrementos de 30 pA hasta que la neurona piramidal generó su primer potencial de acción. Con esto, se determinó la resistencia de entrada, que se calculó como la pendiente entre los valores negativo y positivo en torno al valor de corriente igual a cero (-30, 0 y 30 pA).

Constante de tiempo de carga de corriente membranal (τ): A partir del PMR se inyectó un pulso hiperpolarizante de -30 pA y se determinó el tiempo en que la célula tardó en alcanzar el 63% del valor máximo a la deflexión de voltaje ajustando una función exponencial estándar.

Capacitancia de la membrana: Se obtuvo dividiendo la constante de tiempo entre la resistencia de entrada. (Feenstra et al. 2014)

Corriente rheobase y curva estímulo/respuesta: La corriente rheobase es la intensidad mínima de corriente necesaria para evocar un potencial de acción. Para ello se inyectaron pulsos cuadrados de corriente desde un valor inicial de 0 hasta 300 pA aumentando en incrementos de 30 pA y cada pulso tuvo una duración de 1 segundo.

Utilizando este mismo protocolo se obtuvo el valor de latencia, es decir, el tiempo mínimo necesario para evocar un potencial de acción; también se realizaron curvas de corriente inyectada vs número de potenciales de acción.

Para una representación visual de los patrones de activación o aparición de los potenciales de acción se realizaron *raster plots*.

Para registrar más propiedades neuronales se determinaron los siguientes parámetros regresando a la modalidad de fijación de voltaje (voltage clamp):

AHP: Donde se mantiene inicialmente un potencial de membrana de -50mV, posteriormente se aplica un pulso de voltaje que lleva el potencial de membrana a 75mV durante 50ms y finalmente regresa a -50mV.

Corrientes macroscópicas: En este protocolo se mantiene inicialmente un potencial de membrana de -65mV, después se inyectan pulsos de voltaje desde -100mV, con un delta de 10mV por 0.5s, hasta 60mV.

5.7. Detección de las enzimas CBS, CSE y 3-MST en el área CA1 hipocampal a través de la técnica Western blot

Se obtuvo el tejido mediante el procedimiento descrito anteriormente en el apartado 5.4. con la única diferencia de que se limitó a extraer únicamente el área CA1 hipocampal.

Las muestras obtenidas fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5ml que contenían 200 µl de PBS para ser almacenadas a -70°C hasta su posterior análisis. Las muestras se homogeneizaron con un vástago esmerilado. Posteriormente, las muestras se calibraron y se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó el pellet del sobrenadante y se adicionó 200 µl de buffer RIPA (buffer de lisis), con una composición específica de: NaCl 150 mM, Tritón x100 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, Tris pH 8 50 mM y una tableta de inhibidor de proteasas (cOmplete™, Mini, EDTA- free Protease Inhibitor Cocktail; Sigma- Aldrich; Cat.

No. 4693159001). Después se homogeneizó con un vástago esmerilado y se incubó en hielo por 10 min; las muestras se calibraron y se centrifugaron a 12000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se recolectó y se almacenó a 70°C hasta la cuantificación de las proteínas totales. La cuantificación se realizó mediante el método de Bradford de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit 1; Bio-Rad; Cat. No 5000201). Se tomaron 30 µg de proteína total que fueron separados en un gel SDS-PAGE al 10% durante 90 min a 120V; y subsecuentemente transferidas a una membrana de PVDF durante 60 min a 10V. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en PBS-Tween20 al 0.1%. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-CBS (dilución 1:500; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-133154), anti-CSE (dilución 1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-365381) y anti-3-MST (dilución 1:1000; Sigma-Aldrich; Cat. No. HPA001240). Se utilizó la expresión de β-actina (anti-βactina dilución 1:10000; GeneTex; Cat. No. GTX5512) para normalizar los niveles de expresión de las proteínas. La detección del anticuerpo primario se realizó utilizando un anticuerpo secundario anti-mouse (dilución 1:7000; GeneTex; Cat. No. GTX21311-01) para la β-actina y las enzimas CBS y CSE;

y anti-rabbit para la enzima 3-MST (dilución 1:5000; GeneTex; Cat. No. GTX213110-01). La señal de los inmunoblots se detectó mediante quimioluminiscencia (ChemiDoc™ XRS+ ImagingSystem, Bio-Rad, CA).

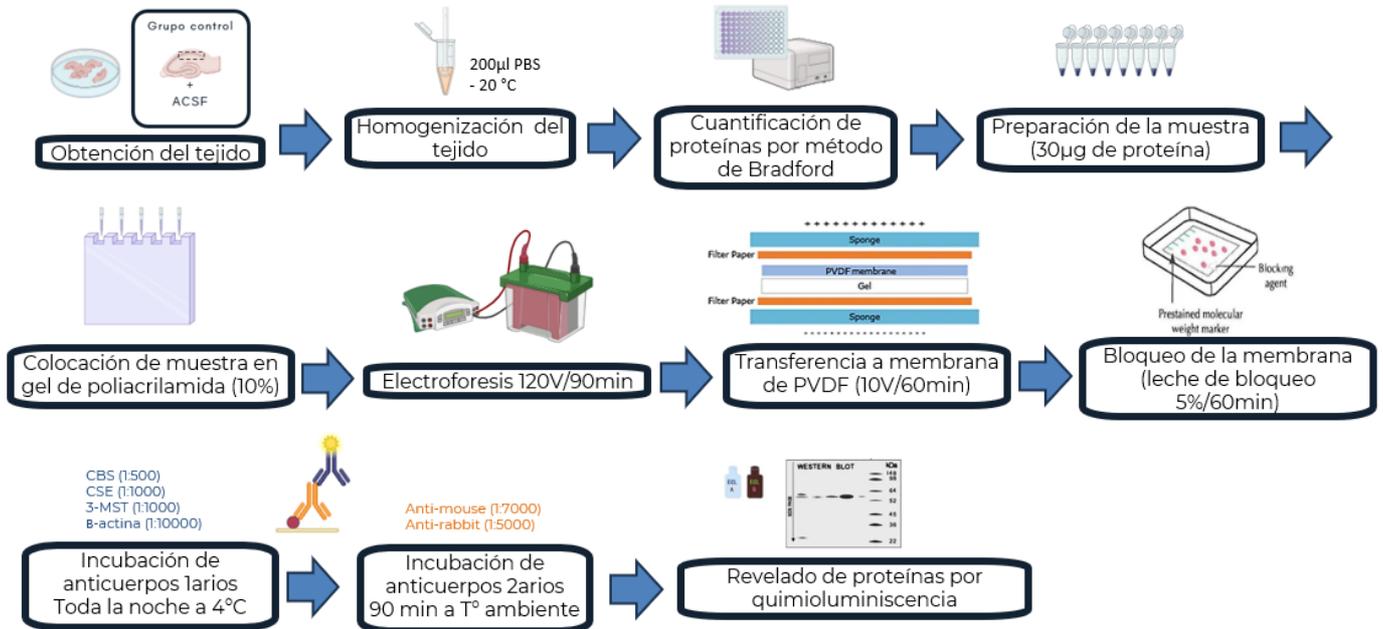


Figura 6. Procedimiento experimental para la realización de la técnica de Western Blot. Se obtuvo el área de interés específica (CA1) y fue homogeneizada en PBS. Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida para posteriormente ser sometidas a un campo eléctrico y separar las proteínas de acuerdo con su peso molecular CBS (63 kDa), CSE (49 kDa), 3-MST (30-35 kDa). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF, misma que después fue bloqueada con leche al 5%. La membrana se incubó con anticuerpos específicos dirigidos para las proteínas de interés, utilizando a la β -actina (42 kDa) como control de carga. Tras la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente, las proteínas fueron reveladas por quimioluminiscencia.

Figura creada con Biorender.com

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las gráficas de electrofisiología se presentan como la media \pm error estándar, y los datos corresponden al número de células registradas (una célula por rebanada). En el análisis comparativo de las propiedades basales entre las células control y posteriormente perfundidas, se emplearon la prueba *t* de Student para datos paramétricos. Para evaluar los análisis de curva I-V y frecuencia de disparo se utilizaron pruebas de ANOVA de dos vías seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni. Las pruebas estadísticas y algunos cálculos matemáticos se realizaron con los programas Clampfit 10.6 (Molecular Devices) y GraphPad Prism 8. Se consideró como valor significativo $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. La perfusión de NaHS a 200 μ M disminuye la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo

La figura 7-A3 muestra los trazos de voltaje representativos ante pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes inyectados a neuronas piramidales de CA1 tanto en el grupo control en color negro, como el grupo con el donador de H₂S a 200 μ M en color morado. Al analizar la relación I-V, el grupo control mostró una menor pendiente con respecto al tratado con 200 μ M de NaHS. Además, el grupo con NaHS a 200 μ M presentó una resistencia de entrada mayor (Figura 7-A1) a la registrada en condición control (R_N control 108.2 ± 16.25 M Ω y con 200 μ M 122.1 ± 19.23 M Ω , prueba t-student pareada). Con respecto a la corriente reobase (Figura 7-B1) no se observó diferencia significativa en el grupo con el NaHS 200 μ M comparado contra el grupo control (rheobase control 107.6 ± 15.64 pA y con 200 μ M 110.1 ± 14.75 pA, prueba t-student pareada). Con respecto a la constante de tiempo membranar (Figura 7-C1), se observó un aumento en el grupo con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control (τ memb control 24.8 ± 2.25 ms y NaHS 200 μ M 39 ± 4.88 , prueba t-student pareada).

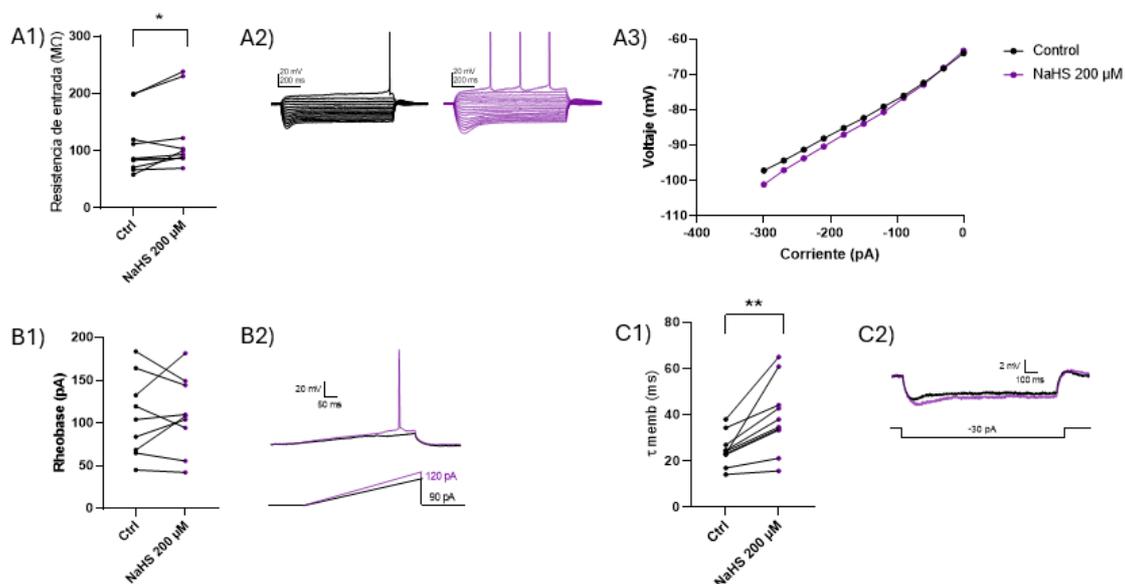


Figura 7. Efectos del NaHS (donador de H₂S) a 200 μ M sobre las propiedades pasivas de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo. En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color morado las de las células bajo el efecto del donador de H₂S a una concentración de 200 μ M. Con la letra **A1** Gráfica de resistencia de entrada. **A2** Trazos representativos del protocolo curva I-V. **A3** Gráfica donde se promedian los valores de las curvas I-V. **B1** Gráfica del valor de corriente reobase obtenido del protocolo de rampa. **B2** Trazos representativos del protocolo de rampa. **C1** Gráfica del valor de τ membranar. **C2** Trazos representativos del protocolo τ membranar. Se tiene una n de 10 células (5 animales).

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Prueba estadística t-student pareada.

También se analizó la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de CA1 con incrementos de 30 pA y una duración de 1 segundo. En la figura 8-a y 8-b se tienen los trazos representativos evocados por la inyección de corriente positiva (300 pA) para ser comparados en el grupo control (en color negro) vs con el donador de H₂S a 200 μ M (en color morado). En la figura 8-B1 se muestran los trazos representativos y el trazo promedio del PA evocado con 300 pA para cada grupo. En la figura 8-B2 se analizó la cinética del PA y se realizó un phase plot.

Del mismo trazo de 300 pA se obtuvieron los datos de las características obteniendo una frecuencia instantánea menor en el grupo con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control (Figura B3; frecuencia instantánea control 23.7 ± 2.2 mV y con NaHS a 200 μ M 15.3 ± 0.93 Hz, prueba t-student pareada), una frecuencia global menor en el grupo con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control (Figura B4; frecuencia global control 21.4 ± 2.2 mV y con NaHS a 200 μ M 13.4 ± 0.74 Hz, prueba t-student pareada), una amplitud del pico menor en el grupo con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control (Figura B5; amplitud del pico control 119.5 ± 3.02 mV y con NaHS a 200 μ M 10.8 ± 3.42 mV, prueba t-student pareada), una duración del pico máximo mayor en el grupo con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control (Figura B6; duración del pico máximo control 1.5 ± 0.04 ms y con NaHS a 200 μ M 1.8 ± 0.05 ms, prueba t-student pareada), una velocidad de subida máxima mayor en el grupo con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control (Figura B7; Pendiente de subida máxima control 180.8 ± 17.36 mV/ms y con NaHS a 200 μ M 94.2 ± 11.02 mV/ms, prueba t-student pareada), una velocidad de decaimiento del potencial de acción menor en el grupo con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control (Figura B8; Pendiente de caída máxima control -70.5 ± 6.54 mV/ms y con NaHS a 200 μ M -39.3 ± 4.73 mV/ms, prueba t-student pareada) y un intervalo entre espigas mayor en el grupo con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control (Figura B9; Intervalo entre espigas control 53.04 ± 7.18 ms y con NaHS a 200 μ M 77.37 ± 5.45 ms, prueba t-student pareada). En la figura 8-C1 se muestra graficada la frecuencia de disparo de las neuronas de CA1 antes (15.73 ± 9.46) y después de perfundir NaHS a 200 μ M (9.456 ± 1.32), evidenciando una disminución en la frecuencia de disparo de las células tras la exposición al donador de H₂S.

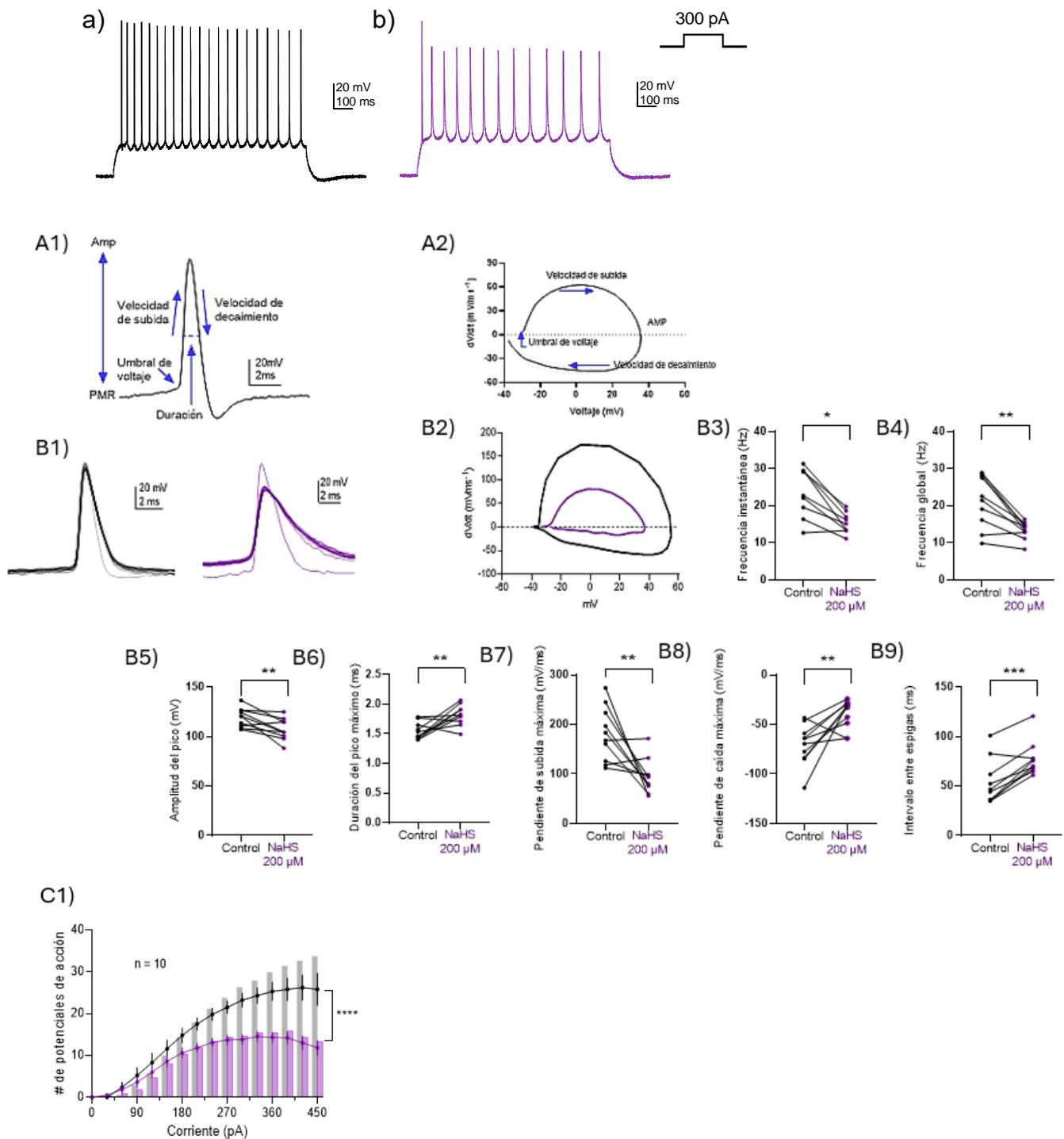


Figura 8. Efectos del donador de H_2S (NaHS) a $200 \mu M$ sobre las propiedades activas de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo. En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color morado las de las células bajo el efecto del donador de H_2S . Con la letra **a y **b** Trazos representativos**

del protocolo frecuencia de disparo a un estímulo de 300pA. **A1** Esquema representativo de un PA y sus fases cuantificables. **A2** Phase plot representativo de un PA y sus fases cuantificables. **B1** Trazos representativos y trazo promedio del PA evocado con 300pA. **B2** Phase plot promedio del PA. **B3** Gráfica comparativa de frecuencia instantánea. **B4** Gráfica comparativa de frecuencia global. **B5** Gráfica comparativa de amplitud del pico. **B6** Gráfica comparativa de duración del pico máximo. **B7** Gráfica comparativa de pendiente de subida máxima. **B8** Gráfica comparativa de pendiente de caída máxima. **B9** Gráfica comparativa de intervalo entre espigas. Se tiene una n de 10 células (5 animales) * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Prueba estadística t-student pareada. Con la letra **C1** Gráfica IO. Se tiene una n de 10 células (5 animales) **** $P < 0.0001$. Prueba estadística ANOVA de dos vías seguida de prueba post hoc Bonferroni.

En el gráfico anterior se observa cómo el grupo con NaHS a 200 μM presenta una menor frecuencia de disparo comparado con el grupo control. Para corroborar lo anterior, se realizó una regresión lineal para determinar el *offset* y la ganancia neuronal. El *offset* representa el umbral de corriente requerido para la actividad neuronal, y la ganancia (*gain*) indica la sensibilidad que tiene la neurona a estímulos o cambios en la corriente. En la figura 9 se muestran los valores de *offset* y la ganancia (*gain*) de cada neurona (Figura 9-A1 *offset* control 111.5 ± 7.46 pA; offset NaHS a 200 μM 93.79 ± 6.91 pA; Figura 9-A2 ganancia control 3.436 ± 0.39 Hz/pA y ganancia NaHS a 200 μM 3.77 ± 0.27 Hz/pA). El grupo con NaHS no presentó diferencia significativa en ganancia con respecto al control, pero si un menor offset.

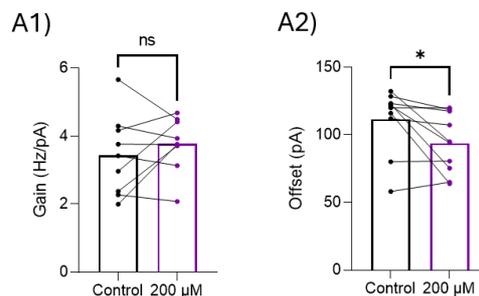


Figura 9. Efecto del donador de H_2S (NaHS) a 200 μM sobre los parámetros que permiten medir las propiedades de disparo de una neurona piramidal de CA1 del hipocampo.

En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color morado las de las células bajo el efecto del donador de H₂S. Con la letra A1 Grafica representativa de ganancia. A2 Grafica representativa de offset.

*Se tiene una n de 10 células (5 animales) * P<0.05. Prueba estadística t-student pareada.*

Con el fin de ilustrar que las neuronas piramidales con NaHS en una concentración de 200 μ M son menos excitables respecto al grupo control, se realizó una representación del cambio en los disparos neuronales o eventos obtenidos a través de *raster plots* (Figura 10-A1 y 10-A2) donde en el eje Y se presenta el número de neuronas piramidales utilizado (en este caso fueron 10 por cada grupo) representando en color negro el grupo control y en morado el grupo con NaHS a 200 μ M, mientras que en el eje X se ubica una escala de tiempo ilustrando el momento en el que se genera un potencial de acción.

En el grupo con NaHS a 200 μ M se encuentran espacios largos entre un PA y otro, lo que favorece esta teoría. Así mismo, se graficó la frecuencia relativa del intervalo entre espigas, es decir, la distribución de los tiempos que transcurren entre disparos consecutivos de potenciales de acción en una neurona (figura 10-B1); a estos datos se les ajustó una distribución Gaussiana para facilitar la interpretación conociendo la tendencia central y la dispersión de los intervalos entre espigas, donde se ratificó que el grupo con NaHS en una concentración de 200 μ M tuvo una media (μ) mayor, con un valor de 68.7, lo que indica que los intervalos entre disparos de PA son más largos en comparación con el grupo control donde la media tiene un valor de 39.8. También se graficaron la constante de tiempo de decaimiento (Figura 10-B3 Tau control 10.8 ± 2.07 ms y con NaHS a 200 μ M 2.47 ± 1.04 ms, prueba t-student pareada) donde hubo una disminución en el grupo tratado con NaHS a 200 μ M respecto al grupo control y la amplitud de los PA (figura 10-B2) que también disminuyó en el grupo tratado con NaHS a 200 μ M (98.31 ± 2.25 mV) respecto al grupo control (113.2 ± 1.05 mV).

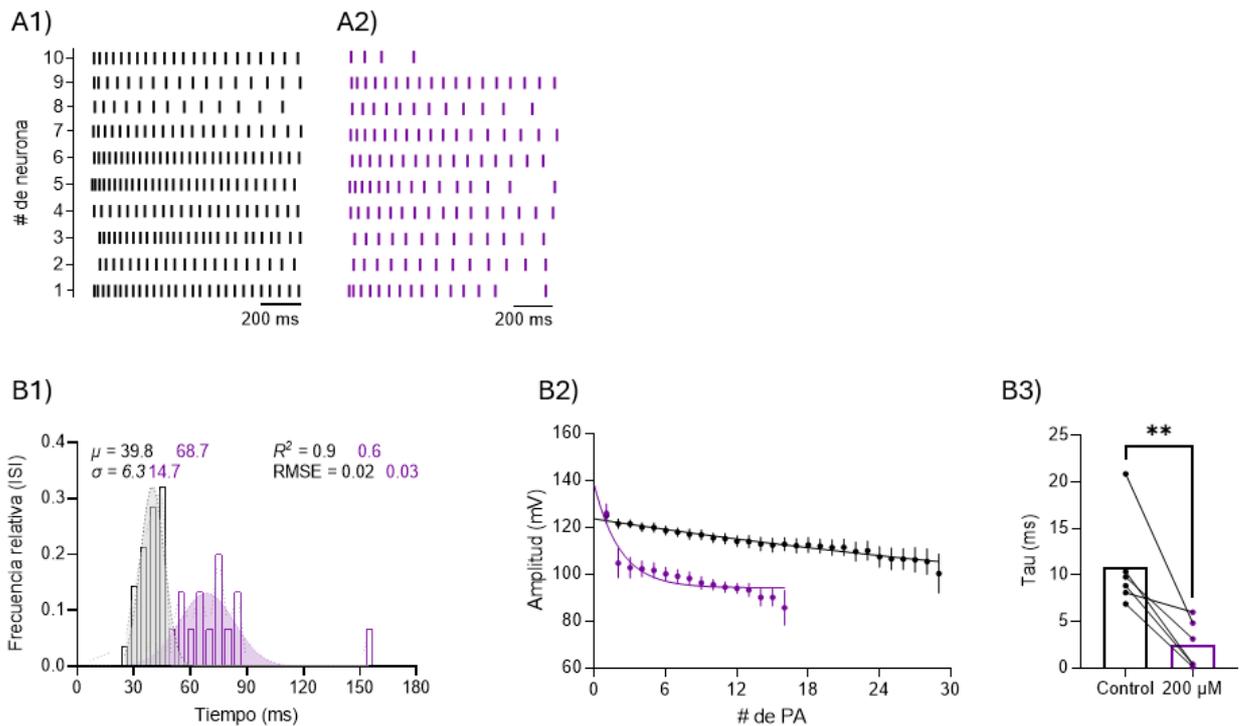


Figura 10. Efecto del donador de H_2S (NaHS) a $200 \mu M$ sobre la cinética de decaimiento de neuronas piramidales de CA1 del hipocampo.

En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color morado las de las células bajo el efecto del donador de H_2S . Con la letra **A1** Raster plots del grupo control. **A2** Raster plots del grupo con NaHS a $200 \mu M$. **B1** Histograma del intervalo entre espigas. **B2** Gráfica representativa de la amplitud de los PA. **B3** Gráfica representativa de la constante de tiempo de decaimiento de los PA. Se tiene una n de 10 células (5 animales) ****** $P < 0.01$. Prueba estadística t-student pareada.

Posteriormente, la fase de post hiperpolarización del potencial de acción se analizó, donde se evaluó la amplitud de la post hiperpolarización rápida (fAHP). (Figura 11-A2). Así, existe una menor amplitud en el grupo con $200 \mu M$ de NaHS (fAHP control -50.52 ± 1.10 mV y NaHS $200 \mu M$ -45.47 ± 1.14 mV), haciendo que esta fase se alargue y no pueda generar otro potencial de acción. También en la figura 11-A4 se representa la corriente que sigue a un PA la cual es menor en el grupo tratado con NaHS a $200 \mu M$ (0.60 ± 0.22 pA) respecto al grupo control (1 ± 0.24 pA).

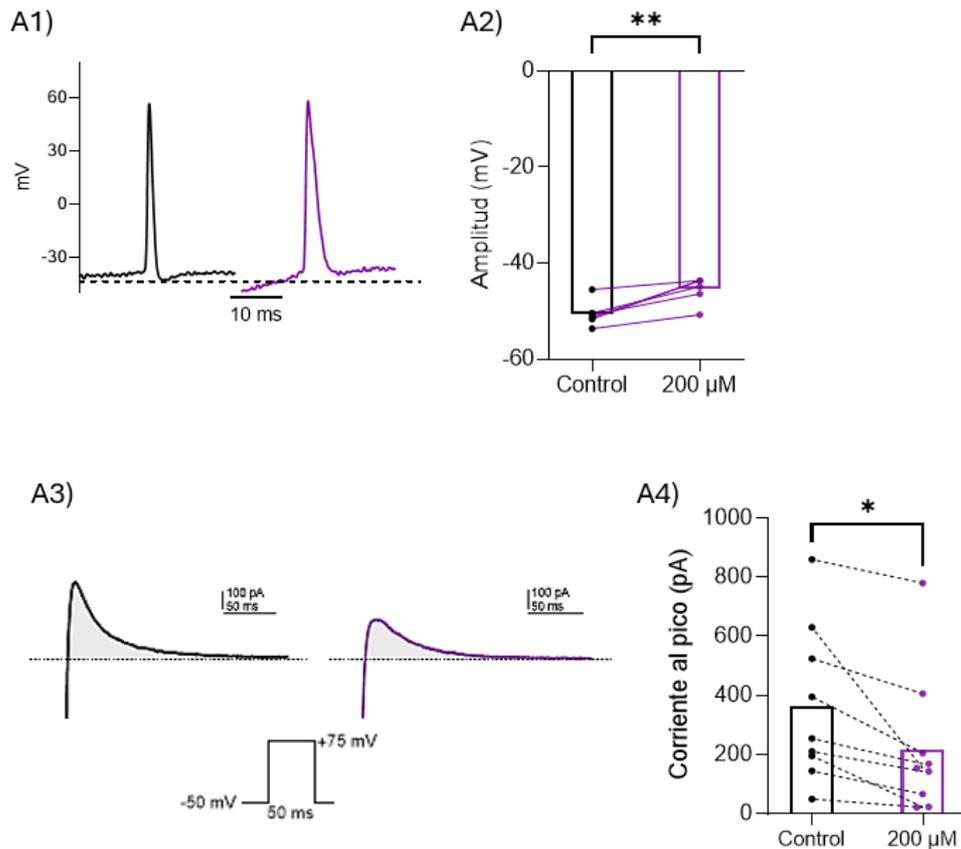


Figura 11. Efecto del donador de H_2S (NaHS) a $200 \mu M$ sobre la fase de post hiperpolarización.

En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color morado las de las células bajo el efecto del donador de H_2S . Con la letra **A1** Trazo representativo del PA. **A2** Gráfica representativa de la amplitud de la fAHP. Se tiene una n de 6 células (5 animales). **A3** Trazo representativo de corriente AHP. **A4** Grafica representativa de la corriente al pico. Se tiene una n de 9 células * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Prueba estadística t-student pareada.

Para contribuir a las características observadas durante la fase de post hiperpolarización se analizaron las corrientes macroscópicas entrantes y salientes. Dentro de las principales corrientes entrantes encontramos la corriente de sodio, la cual es responsable de la entrada de iones Na^+ a la célula, afectando la repolarización y la excitabilidad neuronal (Figura 12-A3 densidad de corriente entrante control -13.21 ± 3.47 pA/pF y disminuye con la perfusión de NaHS $200 \mu M$ -10.71 ± 2.51 pA/pF). En cuanto a las corrientes salientes, son principalmente mediadas por iones de potasio y es fundamental para la generación y

mantenimiento de la AHP. Estas corrientes promueven la salida de iones K^+ de la célula, llevando a la hiperpolarización de la membrana (Figura 12-B3 densidad de corriente saliente control 77.19 ± 3.03 pA/pF y disminuye con la perfusión de NaHS $200 \mu M$ 74.99 ± 2.84 pA/pF).

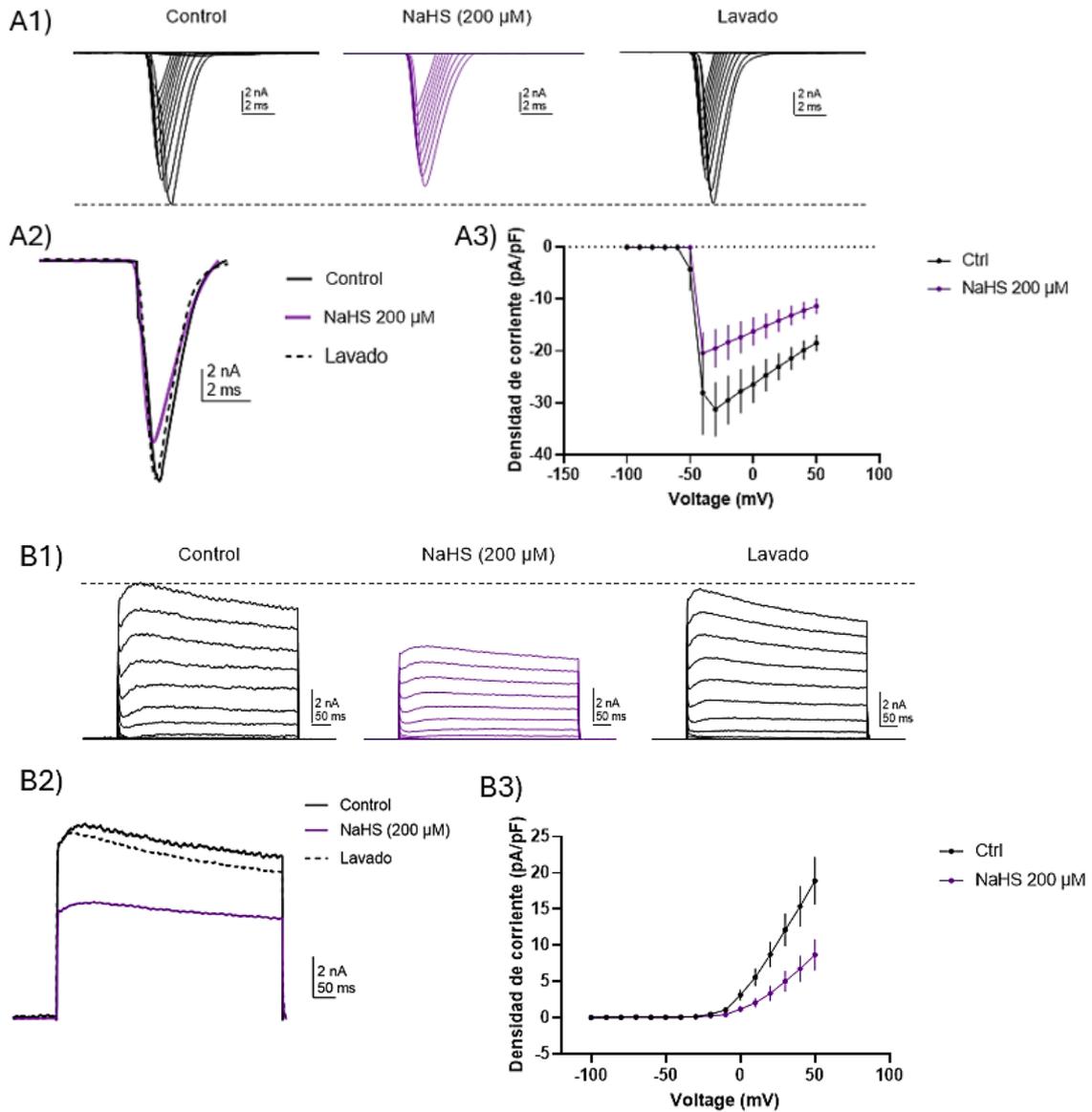


Figura 12. Efecto del donador de H_2S (NaHS) a $200 \mu M$ sobre las corrientes totales macroscópicas.

En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, en color morado las de las células bajo el efecto del donador de H_2S y en color negro con línea punteada después de un lavado de 5 min. Con la letra **A1** Trazos representativos de las

corrientes entrantes de sodio en condiciones control, con NaHS a 200 μ M y después de un lavado de 5 min. **A2** Trazos promedio representativos de las corrientes entrantes de sodio en condiciones control, con NaHS a 200 μ M y después de un lavado de 5 min. **A3** Gráfica representativa de densidad de corriente de sodio. **B1** Trazos representativos de las corrientes salientes de potasio en condiciones control, con NaHS a 200 μ M y después de un lavado de 5 min. **B2** Trazos promedio representativos de las corrientes salientes de potasio en condiciones control, con NaHS a 200 μ M y después de un lavado de 5 min. **B3** Gráfica representativa de densidad de corriente de potasio. Se tiene una n de 6 células (5 animales).

7.2. Expresión de enzimas relacionadas a la síntesis endógena de H₂S.

La figura 13 muestra la presencia de las proteínas CBS en un peso de 63 kDa, CSE en un peso de 49 kDa y 3-MST en un peso de 30-35 kDa además del control actina con un peso de 42 kDa. La expresión de estas proteínas fue determinada mediante Western blot, lo que establece que las neuronas piramidales de CA1 poseen la maquinaria molecular necesaria para sintetizar H₂S de manera endógena.

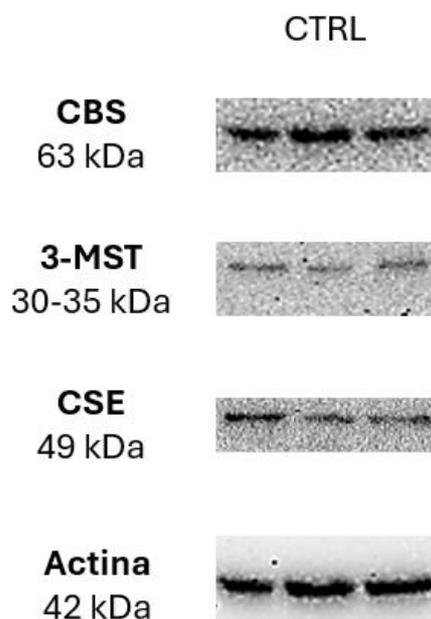


Figura 13. Expresión local de las enzimas CBS, CSE, 3MST en el área CA1 del hipocampo. Imagen representativa de Western blot en el área CA1 del hipocampo. Se utilizó actina como control de carga.

7.3. Curva concentración-respuesta

La figura 14 muestra una curva concentración-porcentaje de inhibición representativa obtenida mediante el área bajo la curva de las curvas IO de 50, 100 y 200 μM . Donde se identificó la concentración óptima (200 μM) para observar un efecto inhibitorio sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1.

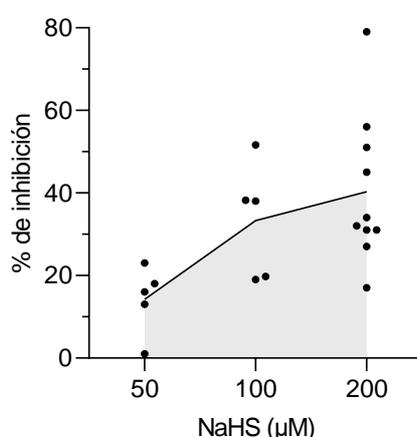


Figura 14. Curva de porcentaje de inhibición a concentraciones de 50, 100 y 200 μM de NaHS en neuronas piramidales de CA1.

Esta figura muestra una curva de concentración-respuesta obtenida mediante el análisis del área bajo la curva de las curvas I-O (corriente vs. respuesta) para neuronas en condición control y tratadas con 50, 100 y 200 μM de NaHS.

Para cada célula, se calculó el área total bajo la curva en las dos condiciones (control y tratada) y se utilizó la fórmula $\frac{V_{\text{control}} - V_{\text{tratada}}}{V_{\text{control}}} \times 100$ para determinar el porcentaje de inhibición de la excitabilidad neuronal.

Los puntos en la gráfica representan el porcentaje de inhibición individual observado en cada concentración de NaHS, mostrando una tendencia a mayor inhibición con el aumento de la concentración, alcanzando un efecto significativo a 200 μM .

7.4. La inhibición de la síntesis endógena de H₂S con AOAA aumenta la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo.

La figura 15-A3 muestra los trazos de voltaje representativos ante pulsos de corriente hiperpolarizantes y despolarizantes inyectados a neuronas piramidales de CA1 tanto en el grupo control en color negro, como el grupo con el inhibidor AOAA a 100 μ M en color rojo. Al analizar la relación I-V, el grupo tratado con AOAA mostró una mayor pendiente con respecto al grupo control. Además, el grupo con AOAA a 100 μ M presentó una resistencia de entrada sin diferencia significativa a la registrada en condición control (R_N control 173.5 ± 12.47 M Ω y con AOAA a 100 μ M 208.9 ± 15.12 M Ω , prueba t-student pareada). Con respecto a la corriente rebase tampoco se obtuvo diferencia significativa en el grupo con el inhibidor AOAA a 100 μ M comparado contra el grupo control (rebase control 99.34 ± 8.768 pA y con AOAA 91.15 ± 10.89 pA, prueba t-student pareada). Con respecto a la constante de tiempo membranar no se observó diferencia significativa en el grupo con AOAA respecto al grupo control (τ memb control 34.68 ± 2.256 ms y AOAA 34.49 ± 1.842 , prueba t-student pareada).

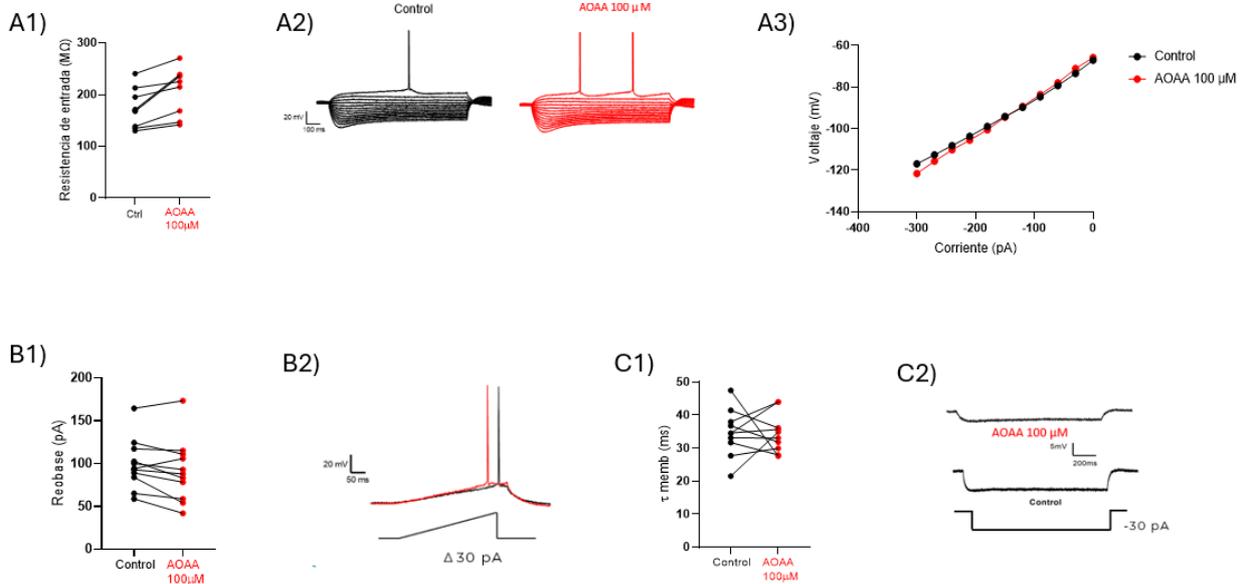


Figura 15. Efectos del inhibidor de enzimas endógenas de H₂S (AOAA) sobre las propiedades pasivas de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo. En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color rojo las de las células bajo el efecto del inhibidor de H₂S. Con la letra **A1** Gráfica de

resistencia de entrada. **A2** Trazos representativos del protocolo curva I-V. **A3** Gráfica donde se promedian los valores de las curvas I-V. **B1** Gráfica del valor de corriente reobase obtenido del protocolo de rampa. **B2** Trazos representativos del protocolo de rampa. **C1** Gráfica del valor del τ memb. **C2** Trazos representativos del protocolo τ memb. Se tiene una n de 10 células (5 animales) Prueba estadística t-student pareada. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Además, se analizó la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de CA1 con incrementos de 30 pA y una duración de 1 segundo. En la figura 16-a y 16-b se tienen los trazos representativos evocados por la inyección de corriente positiva (300 pA) para ser comparados en el grupo control (en color negro) vs con el inhibidor AOAA (en color rojo). De este trazo de 300pA, se obtuvieron los datos de las características como frecuencia instantánea (Figura 16-A1; frecuencia instantánea control 13.24 ± 1.87 mV y con AOAA a $100 \mu\text{M}$ 15.29 ± 2.31 Hz, prueba t-student pareada), frecuencia global (Figura 16-A2; frecuencia global control 12.85 ± 1.65 mV y con AOAA a $100 \mu\text{M}$ 14.98 ± 2.12 Hz, prueba t-student pareada), amplitud del pico (Figura 16-A3; amplitud del pico control 115.7 ± 6.96 mV y con AOAA a $100 \mu\text{M}$ 114.1 ± 8.36 mV, prueba t-student pareada), duración del pico máximo (Figura 16-A4; duración del pico máximo control 1.75 ± 0.076 ms y con AOAA a $100 \mu\text{M}$ 1.85 ± 0.07 ms, prueba t-student pareada), velocidad de subida máxima (Figura 16-A5; Pendiente de subida máxima control 100.1 ± 13.14 mV/ms y con AOAA a $100 \mu\text{M}$ 93.91 ± 12.2 mV/ms, prueba t-student pareada), velocidad de decaimiento del potencial de acción (Figura 16-A6; Pendiente de caída máxima control -50.97 ± 5.72 mV/ms y con AOAA a $100 \mu\text{M}$ -47.22 ± 6.52 mV/ms, prueba t-student pareada) e intervalo entre espigas (Figura 16-A7; Intervalo entre espigas control 100.5 ± 21.16 ms y con AOAA a $100 \mu\text{M}$ 91.36 ± 20.6 ms, prueba t-student pareada). En la figura 16-B1 se muestra el aumento en la frecuencia de disparo de las células de CA1 tras la exposición al donador de AOAA a $100 \mu\text{M}$. (Frecuencia de disparo control 13.85 ± 2.07) y después de perfundir AOAA a $100 \mu\text{M}$ (16.44 ± 2.40). En la figura 16-C1 se analizó la cinética del PA y se realizó un phase plot.

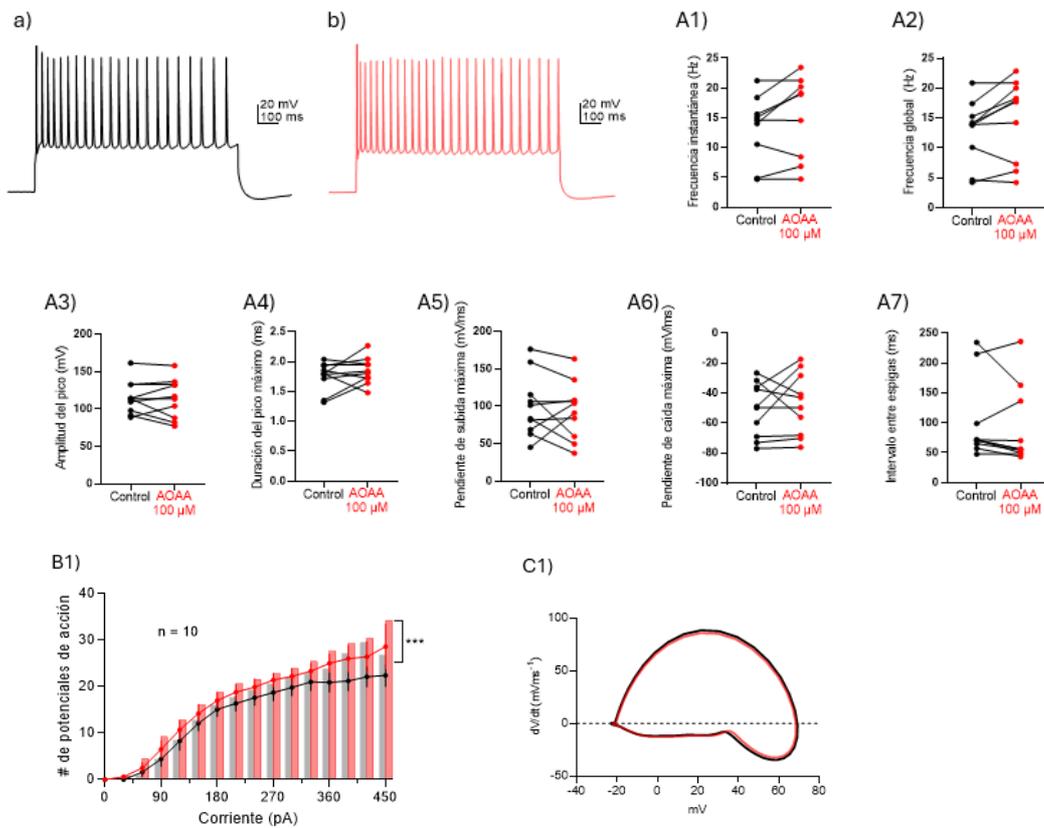


Figura 16. Efectos del inhibidor de enzimas endógenas de H₂S (AOAA) sobre las propiedades activas de las neuronas piramidales de CA1 del hipocampo. En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color rojo las de las células bajo el efecto del inhibidor de H₂S. Con la letra **a** y **b** Trazos representativos del protocolo frecuencia de disparo a un estímulo de 300 pA. **A1** Gráfica comparativa de frecuencia instantánea. **A2** Gráfica comparativa de frecuencia global. **A3** Gráfica comparativa de amplitud del pico. **A4** Gráfica comparativa de duración del pico máximo. **A5** Gráfica comparativa de pendiente de subida máxima. **A6** Gráfica comparativa de pendiente de caída máxima. **A7** Gráfica comparativa de intervalo entre espigas. Con la letra **B1** Gráfica IO. Con la letra **B2** Phase plot promedio del PA. Se tiene una n de 10 células (5 animales).

Posteriormente se realizó una representación del cambio en los disparos neuronales o eventos obtenidos a través de *raster plots* (Figura 17-A1) representando en color negro el grupo control y en rojo el grupo con AOAA a 100 μ M, ilustrando el momento en el que se genera un potencial de acción.

Así mismo, se graficó la frecuencia relativa del intervalo entre espigas (figura 17-B1), donde se ajustó una distribución Gaussiana para facilitar la interpretación conociendo la tendencia central y la dispersión de los intervalos entre espigas, y se demostró que el grupo con AOAA en una concentración de 100 μ M tiene una media (μ) menor, con un valor de 54.2, lo que indica que los intervalos entre disparos de PA son más cortos en comparación con el grupo control donde la media tiene un valor de 62.3. También se graficaron la frecuencia de los PA (Figura 17-B2 frecuencia control 23 ± 1.76 Hz y con AOAA a 100 μ M 24.94 ± 2.0 Hz, prueba t-student pareada) y la amplitud de los PA (Figura 17-B3 amplitud control 103 ± 1.14 mV y con AOAA a 100 μ M 108 ± 0.94 mV, prueba t-student pareada).

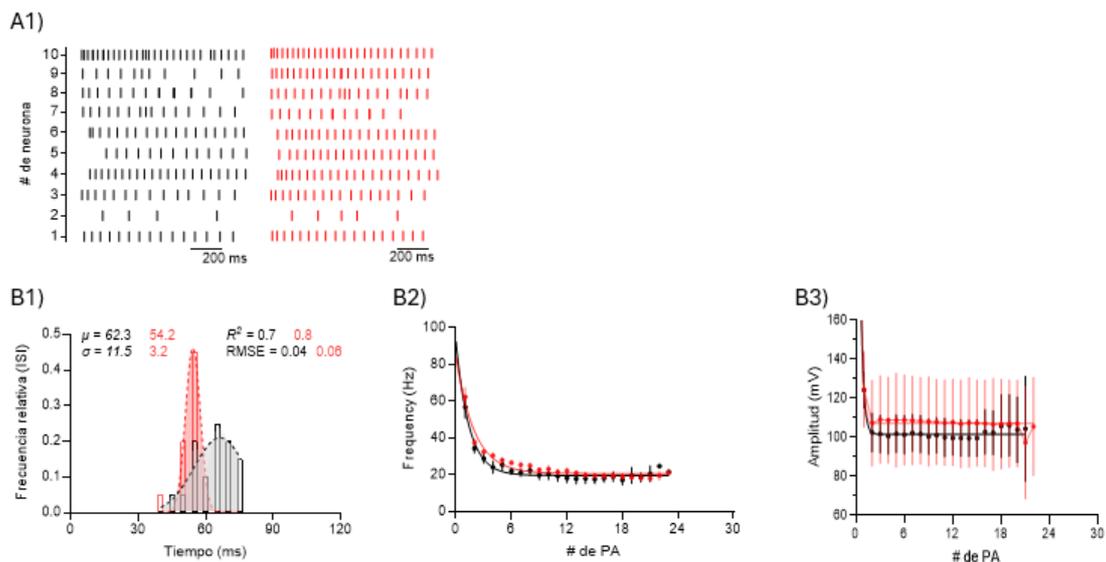


Figura 17. Efecto de AOAA a $100 \mu\text{M}$ sobre la cinética de decaimiento de neuronas piramidales de CA1 del hipocampo.

En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color rojo las de las células bajo el efecto del inhibidor de enzimas endógenas de H_2S . Con la letra **A1** Raster plots representativos de cada grupo. **B1** Histograma del intervalo entre espigas. **B2** Gráfica representativa de la frecuencia de los PA. **B3** Gráfica representativa de la amplitud de los PA. Se tiene una n de 10 células (5 animales). Prueba estadística t-student pareada.

Posteriormente se analizó la fase de post hiperpolarización, donde se evaluó la amplitud de la post hiperpolarización rápida (fAHP). (Figura 18-A2). Existe una mayor amplitud en el grupo con $100 \mu\text{M}$ de AOAA (fAHP control $-45.92 \pm 3.10 \text{ mV}$ y AOAA $100 \mu\text{M}$ $-50.40 \pm 3.14 \text{ mV}$), facilitando la generación de otro potencial de acción. También en la figura 18-A4 se representa la corriente que sigue a un PA la cual es mayor en el grupo tratado con AOAA a $100 \mu\text{M}$ ($1.3 \pm 0.31 \text{ pA}$) respecto al grupo control ($0.93 \pm 0.24 \text{ pA}$).

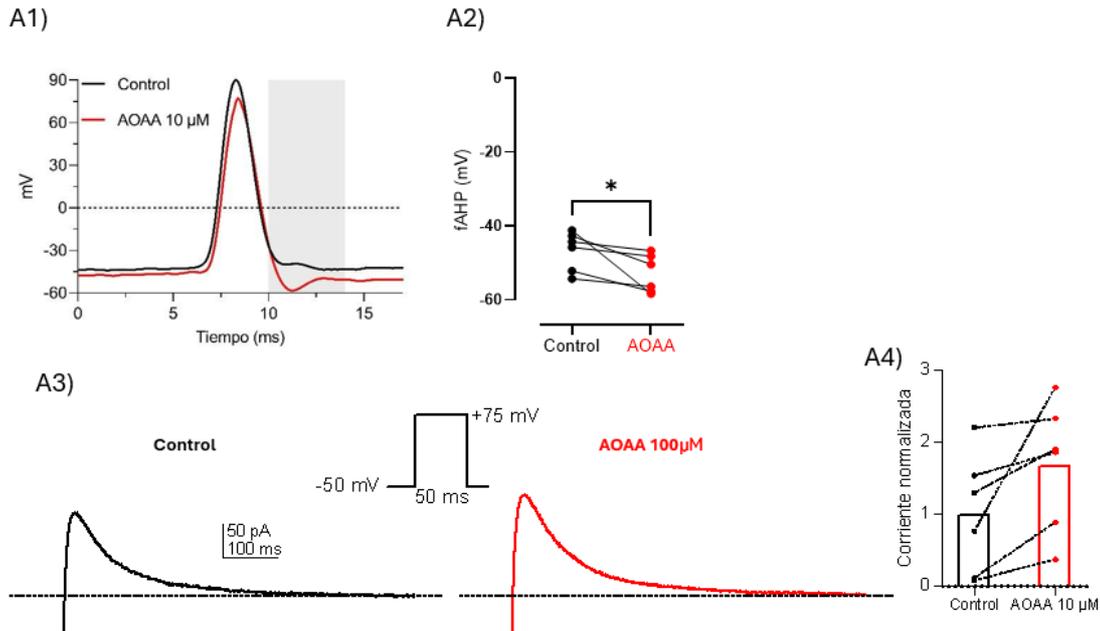


Figura 18. Efecto de AOAA a 100 μM sobre la fase de post hiperpolarización.

En color negro se muestran las propiedades pertenecientes a las células control, mientras que en color rojo las de las células bajo el efecto del inhibidor de enzimas que producen H_2S . Con la letra A1 Trazo representativo del PA. A2 Gráfica representativa de la amplitud de la fAHP. A3 Trazo representativo de corriente AHP. A4 Grafica representativa de la corriente al pico. Se tiene una n de 6 células (5 animales).

* $P < 0.05$;

Prueba estadística t-student pareada.

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo demostrar que el gasotransmisor H_2S tiene efectos fisiológicos en las propiedades pasivas y activas de las neuronas glutamatérgicas del SNC. Tanto la supresión de su producción de manera endógena (mediante el bloqueo de las enzimas) como la perfusión de donadores de sulfuro modularon de manera directa, la capacidad de disparar potenciales de acción de las células piramidales del hipocampo y, por ende, modularon los niveles de excitabilidad del circuito mesolímbico. De manera más específica, nuestros experimentos demostraron que la perfusión de NaHS en

concentraciones crecientes, simulando el rango fisiológico al que se encuentra el H₂S en el cerebro, redujo la frecuencia de disparo neuronal, sugiriendo una modulación significativa de la excitabilidad intrínseca al compararse con las células control.

Nuestros resultados sugieren que una concentración de 200 μM de H₂S, es relevante para la modulación de la función neuronal, ofreciendo perspectivas sobre posibles mecanismos subyacentes para futuras aplicaciones terapéuticas en la neurobiología. Esto se confirmó a través de la construcción de la curva de concentración-respuesta, donde se identificó que 200 μM de NaHS es la concentración óptima para observar un efecto inhibitorio significativo sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 obteniendo una base sólida del efecto fisiológico del H₂S.

Sin embargo, los resultados que se obtuvieron para el objetivo 1 contrastan con los hallazgos reportados por Dallas et al. 2021, donde se reportó que el tratamiento con NaHS incrementa la excitabilidad en neuronas hipocampales de rata; este contraste puede deberse a diferencias en las metodologías experimentales utilizadas, entre ellas destacan el modelo experimental utilizado (rebanadas de hipocampo vs cultivos neuronales) y las condiciones de perfusión.

En nuestro estudio utilizamos rebanadas del área CA1 hipocampal, lo cual podría presentar un entorno bioquímico diferente al de los cultivos neuronales influyendo en la respuesta al NaHS.

La persulfuración de los canales iónicos es un mecanismo reconocido a través del cual el H₂S modula la función neuronal. Sin embargo, la inhibición de la excitabilidad observada en nuestro estudio sugiere que el NaHS podría afectar vías de señalización diferentes o adicionales en las rebanadas de CA1, lo que explicaría la disminución de la excitabilidad. También podrían estar involucradas a este efecto otro tipo celular que no se encuentra en los cultivos y que interactúe con H₂S modificando su efecto, como las células gliales.

Nuestros hallazgos tienen implicaciones importantes para entender el papel del H₂S en la modulación de la excitabilidad neuronal.

Además, destacan que se deben realizar estudios adicionales para entender mejor las condiciones bajo las cuales el H₂S modula la excitabilidad neuronal de manera diferencial.

En nuestros experimentos, la perfusión de NaHS (200 μM) en rebanadas de CA1 del hipocampo resultó en una disminución de las corrientes macroscópicas entrantes y

salientes, sugiriendo una modulación significativa de la excitabilidad neuronal por H₂S, donde este compuesto podría estar afectando la actividad de los canales de potasio y de sodio, reduciendo las corrientes entrantes de sodio (lo que disminuye la despolarización) y las corrientes salientes de potasio (lo que puede alterar la repolarización).

En cuanto a los resultados ante la inhibición de la síntesis endógena de H₂S mediante AOAA a 100 μM, aumenta la excitabilidad intrínseca de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. La relación I-V obtenida muestra una mayor pendiente en el grupo tratado con AOAA, indicando un aumento en la excitabilidad neuronal, posiblemente relacionado con cambios en la conductancia iónica. A pesar de este incremento, no se observaron diferencias significativas en la resistencia de entrada, la corriente rebase o la constante de tiempo membranaral entre los grupos control y con AOAA, sugiriendo que las propiedades pasivas de la membrana y los mecanismos básicos de iniciación de potenciales de acción permanecen intactos, sin embargo, el aumento significativo en la frecuencia de disparo observado con AOAA resalta que la inhibición de la síntesis de H₂S eleva la excitabilidad general de las neuronas, posiblemente debido a una disminución en la influencia inhibitoria de H₂S sobre ciertos canales iónicos o a un incremento en la disponibilidad de neurotransmisores excitatorios.

Al mismo tiempo, se observó un aumento en la fAHP, lo que sugiere que la inhibición de H₂S podría estar potenciando la actividad de canales de potasio activados por calcio, que contribuyen a la fAHP. Este aumento en la fAHP podría inicialmente parecer contradictorio con el incremento en la excitabilidad; sin embargo, podría interpretarse como una respuesta compensatoria parcial que, aunque no suficiente para revertir el aumento global en la excitabilidad, influye en la dinámica del disparo neuronal al permitir una recuperación más rápida después de cada potencial de acción, facilitando así una mayor frecuencia de disparo al permitir a las neuronas repolarizarse más rápidamente y prepararse para el siguiente potencial de acción.

La demostración de la presencia de CBS, CSE y 3MST mediante Western blot, es un hallazgo que establece que las neuronas piramidales de CA1 poseen la maquinaria molecular necesaria para sintetizar H₂S de manera endógena. Este resultado respalda que el H₂S puede actuar localmente como modulador de la excitabilidad neuronal. Confirmando que las enzimas CBS, CSE, y 3MST podrían ser objetivos relevantes para intervenir terapéuticamente modulando los niveles de H₂S en el cerebro.

9. CONCLUSIÓN

En este estudio aportamos hallazgos sobre el H₂S en el área CA1 del hipocampo, demostrando que dicha área cuenta con la maquinaria bioquímica responsable para sintetizar H₂S, y que el H₂S regula la actividad de neuronas piramidales de CA1 modificando la excitabilidad intrínseca de estas células; Es decir, actuando como un neuromodulador fisiológico de esta región.

10. PERSPECTIVAS

- Identificar los mecanismos precisos por los cuales NaHS modula los canales neuronales en el área CA1 del hipocampo, proporcionando una comprensión detallada de cómo destaca el posible papel de la S-sulfuración y otras vías de señalización.
- Analizar las diferencias en la actividad de las neuronas piramidales de las regiones CA3 y CA1 del hipocampo en respuesta a la perfusión de H₂S exógeno.
- Explorar las respuestas sinápticas mediante registros extracelulares para determinar el efecto del H₂S en la integración sináptica y plasticidad de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo.
- Explorar los efectos de H₂S en diferentes modelos patológicos con enfoque en cómo podría beneficiar en condiciones de hiperexcitabilidad neuronal.
- Realizar estudios de conducta en animales para evaluar cómo la modulación de la excitabilidad neuronal por H₂S influye en funciones cognitivas.

11. REFERENCIAS

- Abe K. and Kimura H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neuroscience* (16) Issue 3 Pages 1066-71.
- Amaral, D.G., and Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31: 571-591.
- Chen, X., Jhee, KH y Kruger, WD (2004). Producción del neuromodulador H₂S por la cistationina β-sintasa a través de la condensación de cisteína y homocisteína. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (50), 52082-52086.

- Cirino G., Szabo C., and Papapetropoulos. (2023). Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs. *Physiol. Rev.* Vol. 103 Pages 31-276.
- Dallas, M.L., Al-Owais, M.M., Hettiarachchi, N.T. *et al.* (2021) Hydrogen sulfide regulates hippocampal neuron excitability via S-sulphydration of Kv2.1. *Sci Rep* 11, 8194. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87646-5>.
- Daoudal, G., y Debanne, D. (2003). Plasticidad a largo plazo de la excitabilidad intrínseca: reglas y mecanismos de aprendizaje. *Aprendizaje y memoria*, 10 (6), 456-465.
- Dilek, N., Papapetropoulos, A., Toliver-Kinsky, T., & Szabo, C. (2020). Sulfuro de hidrógeno: un regulador endógeno del sistema inmunológico. *Investigación farmacológica*, 161 , 105119.
- Elies J, Scragg JL, Huang S, Dallas ML, Huang D, MacDougall D, Boyle JP, Gamper N, Peers C. (2014). Hydrogen sulfide inhibits Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels. *FASEB J.* Dec;28(12):5376-87. DOI: 10.1096/fj.14-257113. PMID: 25183670.
- Feenstra, Bjarke *et al.* (2014). “Common Variants Associated with General and MMR Vaccine-Related.
- Fujii, K., Sakuragawa, T., Kashiba, M., Sugiura, Y., Kondo, M., Maruyama, K., ... y Suematsu, M. (2005). Sulfuro de hidrógeno como modulador endógeno de la excreción biliar de bicarbonato en el hígado de rata. *Antioxidantes y señalización redox*, 7 (5-6), 788-794.
- Gil, V., Parsons, SP, Gallego, D., Huizinga, JD, y Jiménez, M. (2013). Efectos del sulfuro de hidrógeno sobre los patrones de motilidad en el colon de la rata. *British journal of pharmaceuticalology* , 169 (1), 34-50.
- Gadalla, M. M., & Snyder, S. H. (2010). Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *Journal of neurochemistry*, 113(1), 14-26.
- Green, J.D. (1964). The hippocampus. *Physiol. Rev.* 44: 561-608.
- Kimura H. (2007). Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol.*; 36(1):1-7. doi:10.1007/s12035-007-0001-6.

- Kimura, H. (2018). Hydrogen sulfide and polysulfides as signaling molecules. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 94(8), 347-363. DOI: 10.2183/pjab.94.022.
- Kimura, Y., Dargusch, R., Schubert, D., Kimura, H., (2006). Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal.* 8, 661–670. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.661>
- Kombian, S.B., Reiffenstein, R.J., Colmers, W.F., 1993. The actions of hydrogen sulfide on dorsal raphe serotonergic neurons in vitro. *J. Neurophysiol.* 70, 81–96. <https://doi.org/10.1152/jn.1993.70.1.81>.
- Krishnan, N., Fu, C., Pappin, D. J., & Tonks, N. K. (2011). H₂S -Induced sulfhydrylation of the phosphatase PTP1B and its role in the endoplasmic reticulum stress response. *Science signaling*, 4(203), ra86-ra86.
- Kulbacka, J., Choromańska, A., Rossowska, J., Weźgowiec, J., Saczko, J., & Rols, M. P. (2017). Cell membrane transport mechanisms: Ion channels and electrical properties of cell membranes. In *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* (Vol. 227). https://doi.org/10.1007/978-3-319-56895-9_3.
- Llinás, R. R. (2014). Intrinsic electrical properties of mammalian neurons and CNS function: A historical perspective. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 8, Issue November). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00320>.
- Lu, M., Zhao, FF, Tang, JJ, Su, CJ, Fan, Y., Ding, JH, ... y Hu, G. (2012). La neuroprotección del sulfuro de hidrógeno contra la degeneración de neuronas dopaminérgicas inducida por MPTP implica el desacoplamiento de la proteína 2 en lugar de los canales de potasio sensibles al ATP. *Antioxidants & redox signaling*, 17 (6), 849-859.
- Margrie, T. W., Brecht, M., & Sakmann, B. (2002). In vivo, low-resistance, whole-cell recordings from neurons in the anaesthetized and awake mammalian brain. *Pflügers Archive-European Journal of Physiology*, 444(4), 491-498.
- Mozzachioldi, R., & Byrne, J. H. (2010). More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends in neurosciences*, 33(1), 17-26.

- Mustafa, A.K., Gadalla, M.M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S.K., Barrow, R.K., Yang, G., Wang, R., Snyder, S.H., (2009). H₂S Signals Through Protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.* 2, ra72–ra72. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>.
- Pan, L. L., Liu, X. H., Gong, Q. H., Yang, H. B., Zhu, Y. Z. (2012). Role of cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway in cardiovascular disease: A novel therapeutic strategy? *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(1), 106-118. DOI: 10.1089/ars.2011.4326.
- Papapetropoulos, A. Whiteman, M., and Cirino G. (2015). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br. J. Pharmacol.* (172) Issue 6 Pages 1633-1637.
- Paul, B.D., Sbodio, J.I., Xu, R., Vandiver, M.S., Cha, J.Y., Snowman, A.M., Snyder, S.H., 2014. Cystathionine γ -lyase deficiency mediates neurodegeneration in Huntington's disease. *Nature* 509, 96–100.
- Paul, B.D., Snyder, S.H., 2015b. Modes of Physiologic H₂S Signaling in the Brain and Peripheral Tissues. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 411–423. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5917>.
- Polhemus, D. J., Lefer, D. J. (2014). Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease. *Circulation Research*, 114(4), 730-737. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.300505.
- Polhemus D. J., Li Z., Pattillo C. B., *et al.* (2015). A novel hydrogen sulfide prodrug, SG1002, promotes hydrogen sulfide and nitric oxide bioavailability in heart failure patients. *Cardiovasc Ther* (33) Issue 4 Pages 216-26.
- Reiffenstein, R. J., Hulbert, W.C. and Roth, S. H. (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (32) 109-34.
- Szabo C. and Papapetropoulos. (2017). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev* (69) Pages 497-564.
- Searcy, D. G., & Lee, S. H. (1998). Sulfur reduction by human erythrocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 282(3), 310-322.
- Sestito, *et al.* (2019). Design and synthesis of H₂S -donor hybrids: A new treatment for Alzheimer's disease? *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 184, ISSN 0223-5234, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111745>.

- Schulz, D. J. (2006). Plasticity and stability in neuronal output via changes in intrinsic excitability: It's what's inside that counts. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 209, Issue 24). <https://doi.org/10.1242/jeb.02567>.
- Tang, G., Zhang, L., Yang, G., Wu, L., y Wang, R. (2013). Inhibición inducida por sulfuro de hidrógeno de los canales de Ca²⁺ de tipo L y la secreción de insulina en células beta pancreáticas de ratón. *Diabetologia* , 56 (3), 533-541.
- Tripatara, P., SA Patel, N., Collino, M., Gallicchio, M., Kieswich, J., Castiglia, S., y Thiemermann, C. (2008). La generación de sulfuro de hidrógeno endógeno por la cistationina γ -liala limita la lesión y la disfunción renales por isquemia/reperfusión. *Laboratory research* , 88 (10), 1038-1048.
- Tripathi, Sunil Jamuna, Suwarna Chakraborty, Emiko Miller, Andrew A. Pieper, and Bindu D. Paul. (2023). Hydrogen sulfide signalling in neurodegenerative diseases, *Br J Pharmacol*, <https://doi.org/10.1096/fj.02-0211hyp>.
- Wang, R., (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16, 1792–1798.
- Wang, R., (2003). The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid|1. Redox Signal.* 5.
- Wang R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.* 2012 Vol. 92 Issue 2 Pages 791-896.
- Wang, R., (2014). Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem. Sci.* 39, 227–32. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.003>.
- Warencya, Goodwin, Benishin, Reiffenstein, Francom, Taylor, *et al.* (1989). Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol* (38) Issue 6 Pages 973-81.
- Whiteman, M., Le Trionnaire, S., Chopra, M., Fox, B., Whatmore, J. (2011). Emerging role of hydrogen sulfide in health and disease: Critical appraisal of biomarkers and pharmacological tools. *Clinical Science*, 121(11), 459-488. DOI: 10.1042/CS20110070.
- Whiteman M., Li L., Kostetski I., Chu S. H., Siau J. L., Bhatia M., *et al.* (2006). Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediator's nitric oxide

- and hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun* (343) Issue 1 Pages 303-310.
- Xue Yang, Chudong Wang, Xudong Zhang, Siqi Chen, Liangpei Chen, Shanshan Lu, Shuang Lu, Xisheng Yan, Kun Xiong, Fengxia Liu, Jie Yan. (2019). Redox regulation in hydrogen sulfide action: From neurotoxicity to neuroprotection, *Neurochemistry International*, Volume 128, p.p. 58-69, ISSN 0197-0186, <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.04.011>.
- Yakovlev, Evgeniya D. Kurmasheva, Rashid Giniatullin, Ilgam Khalilov, Guzel F. Sitdikova, (2017). Hydrogen sulfide inhibits giant depolarizing potentials and abolishes epileptiform activity of neonatal rat hippocampal slices, *Neuroscience*, Volume 340, p.p. 153-165, ISSN 0306-4522, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.051>.
- Yamamoto, J., Sato, W., Kosugi, T., Yamamoto, T., Kimura, T., Taniguchi, S., ... y Niki, I. (2013). Distribución de las enzimas productoras de sulfuro de hidrógeno (H₂S) y las funciones del donante de H₂S, el hidrosulfuro de sodio, en la nefropatía diabética. *Nefrología clínica y experimental* , 17 , 32-40.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO Journal*, 20(21), 6008-6016. DOI: 10.1093/emboj/20.21.6008.
- Zuhra, K., Augsburger, F., Majtan, T., y Szabo, C. (2020). Cistationina-β-sintasa: regulación molecular e inhibición farmacológica. *Biomolecules*, 10 (5), 697.
- Zuo, C., Huang, YM, Jiang, R., Yang, HF, Cheng, B. y Chen, F. (2014). Disfunción eréctil inducida por deficiencia de andrógenos y sulfuro de hidrógeno endógeno en ratas. *Zhonghua nan ke xue= National Journal of Andrology* , 20 (7), 605-612.

