



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Neuroglobina y cambio climático. Impacto sobre hipoxia,  
isquemia y estrés oxidativo.

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

JOSÉ EMANUEL ARANA MEJÍA

ASESORA:

DRA. MA. DEL CARMEN HERNÁNDEZ JAIMES

COASESOR:

DR. BENJAMIN VALLADARES CARRANZA

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

# CONTENIDO

RESUMEN .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. GLOBINAS .....	4
1.1.1 NEUROGLOBINA .....	5
1.1.1.1 Distribución sistémica de la Ngb .....	7
1.1.1.2 Distribución intracelular de la Ngb.....	8
1.1.1.3 Filogenética de la Ngb .....	8
1.1.2 FUNCIONES DE LA NEUROGLOBINA .....	9
1.1.2.1 Funcion antiapoptótica .....	12
1.1.2.1.1 Vía intrínseca mitocondrial.....	13
1.1.2.1.2 Ngb y control de la apoptosis.....	13
1.1.2.2 Función antioxidante .....	17
1.1.2.2.1 Especies reactivas y radicales libres .....	18
1.1.2.2.2 Ngb y sistemas antioxidantes .....	23
1.2 CAMBIO CLIMÁTICO.....	29
1.2.1 Cambio climático y sus efectos hipóxicos, isquémicos y oxidantes en sistema nervioso .....	29
1.2.1.1 Hipoxia.....	29
1.2.1.2 Isquemia .....	30
1.2.2 Olas de calor como causantes de hipoxia.....	31
1.2.3 Gases contaminantes como causantes de ictus e hipoxia .....	32
1.2.4 Radiación UV causante de estrés oxidativo .....	34
1.2.5 Neuroglobina ante hipoxia e isquemia .....	37
1.2.5.1 Hipoxia y Ngb.....	37
1.2.5.2 Isquemia cerebral y Ngb .....	38
1.2.5.3 Mecanismo protector de Ngb ante hipoxia/isquemia .....	38
CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	40
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN .....	40
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS .....	41

CAPÍTULO 5. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN .....	41
CAPÍTULO 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	42
CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO .....	45
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES .....	45
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Características de las globinas de vertebrados.</b> Ngb pertenece a la familia proteica de las globinas, pero difiere en su ubicación y función.....	5
<b>Figura 2. Estructura 3D de Ngb humana.</b> En verde, se muestran las cadenas de histidina (His 64 e His 96) interactuando con el grupo hemo resaltado en amarillo. ....	6
<b>Figura 3. Esquema de los grupos hemos en su forma ferrosa-unida a ligando, ferrosa desoxigenada y férrica.</b> El ion hierro del grupo prostético hemo puede encontrarse en su forma férrica o ferrosa, además, este ion puede hallarse hexacoordinado o pentacoordinado. ....	7
<b>Figura 4. Comparación de Ngb humana y murina.</b> Comparación entre la neuroglobina humana y de ratón (HsaNGB y MmuNgb) con las mioglobinas (HsaMB, número de acceso M14603; MmuMb, P04247) y las hemoglobinas a y b (HsaHBA, J00153; HsaHBB, M36640; MmuHba, A45964; MmuHbb, P02088). La estructura secundaria de la hemoglobina humana b está superpuesta en la fila superior. Las a-hélices se designan de la A a la H, los aminoácidos conservados entre las neuroglobinas y las mioglobinas o hemoglobinas están sombreados. Las posiciones de los intrones en la secuencia Ngb humana (en B12-2, E11-0 y G7-0) se indican con flechas. Los aminoácidos no conservados entre HsaNGB y MmuNgb se encuentran sombreados en azul. ....	9
<b>Figura 5. Mecanismos de actividad antiapoptotica de Ngb.</b> Modelo esquemático de la vía activada intracelular E2 que afecta los niveles de expresión/localización intracelular de Ngb y el papel anti apoptótico relacionado tanto de Ngb mitocondrial como de AKT que parece estar doblemente vinculado con la función de Ngb. E2: 17β-estradiol; ERα: receptor de estrógenos α; PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa, Cyt-c: citocromo c.. A) Cyt-c es liberado al citosol. B) Ngb se une a Cyt-c e impide su liberación. C) Ngb modula la permeabilidad de la membrana mitocondrial.....	15
<b>Figura 6. Estructura tridimensional predicha mediante estudios de acoplamiento entre Ngb y Cyt-c.</b> El complejo proteico formado inhabilita la	

disponibilidad de los residuos de aminoácidos de Cyt-c necesarios para unirse a APAF1 y formar el apoptosoma. ....	16
<b>Figura 7. Reacción en cadena de formación de radicales libres por otro radical.</b> Un radical libre B extrae un electrón del átomo A para estabilizar su estructura química, al mismo tiempo el átomo A, antes estable, se convierte en un radical libre. ....	19
<b>Figura 8. Enzimas antioxidantes y sus reacciones.</b> Enzima superóxido dismutasa SOD, enzima catalasa CAT, GR glutatión reductasa, GP glutatión peroxidasa. ....	24
<b>Figura 9. Representación esquemática de la actividad antioxidante de Ngb.</b> La vía de activación intracelular de E2 que afecta tanto a los niveles de expresión como a la localización intracelular de NGB y la localización intracelular, y la vía NRF-2, que describen cómo se entrecruzan dentro de las células del cáncer de mama y afectan al estrés oxidativo. ....	26
<b>Figura 10. Inhibición de COX por Ngb.</b> La generación de NO por parte de Ngb compete con el O <sub>2</sub> por el sitio activo de la enzima. ....	28
<b>Figura 11 Mecanismos moleculares neuroprotectores de Ngb.</b> <i>La proteína Ngb potencia la neuroregeneración al interferir en diferentes procesos y vías moleculares implicados en la neurogénesis y la restitución de la red neuronal.</i> .....	39

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de los efectos de la modulación del nivel de neuroglobina en el cerebro. ....	10
<b>Tabla 2.</b> Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. ....	19
<b>Tabla 3.</b> Especies reactivas y su origen en el organismo. ....	20

## ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>Hgb</b>	Hemoglobina
<b>Mgb</b>	Mioglobina
<b>Cgb</b>	Histoglobina
<b>Ngb</b>	Neuroglobina
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Cyt-c</b>	Citocromo c
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>PI3K/AKT</b>	Fosfatidilinositol 3 quinasa/ AKT
<b>E2</b>	17 $\beta$ -estradiol
<b>Glu</b>	Ácido glutámico
<b>Lys</b>	Lisina
<b>Arg</b>	Arginina
<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>VDAC</b>	Canal aniónico dependiente de voltaje
<b>OGD</b>	Deprivación de oxígeno y glucosa
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>RNS</b>	Especies reactivas del nitrógeno
<b>SOD</b>	Super oxido dismutasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>Nrf-2</b>	Factor nuclear Nrf-2
<b>ARE</b>	Elemento de respuesta antioxidante
<b>GCLM</b>	Modificador de glutamato-cisteína ligasa
<b>HMOX1</b>	Hemo oxigenasa deciclada 1
<b>NQO1</b>	NADPH: Quinona oxidoreductasa 1
<b>MCF-7</b>	Línea celular de cáncer de mama MCF-7
<b>E<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrógenos alfa
<b>COX</b>	Citocromo c oxidasa

<b>ACM</b>	Arteria cerebral media
<b>MCAO</b>	Oclusión de arteria cerebral media
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>MPTP</b>	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial
<b>GEI</b>	Gases de efecto invernadero
<b>PM</b>	Material particulado
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>CFC</b>	Clorofluorocarbonos

## RESUMEN

Neuroglobina (Ngb) es una proteína descubierta en el año 2000 cuya actividad ha sido descrita como neuro protectora ante condiciones adversas que comprometen la fisiología del sistema nervioso. A Ngb se le atribuyen funciones antiapoptóticas, antioxidantes, promotoras de la supervivencia neuronal ante isquemia o condiciones de hipoxia y en menor grado funciones relacionadas con el transporte de oxígeno, sin embargo, algunos de los mecanismos por los cuales lleva a cabo estas funciones aún no se comprenden de manera total.

El cambio climático es un fenómeno global que ha causado la alteración de las condiciones ambientales en las que se desarrolla la vida, sin embargo, la literatura que lo relaciona con daño neurológico es poca. Por tanto, la presente investigación documental profundiza la posible relación del cambio climático sobre la expresión de neuroglobina para preservar la homeostasis del sistema nervioso en un contexto donde las condiciones ambientales actuales favorecen el deterioro neurológico destacando la inducción por golpes de calor, exposición a gases contaminantes y radiación ultravioleta.

La evidencia reportada revela que la protección que brinda la Ngb al sistema nervioso, se ve debilitada con el paso del tiempo, mientras que la progresión del cambio climático aumenta exponencialmente. Tal caso podría ser un precedente al desarrollo de múltiples trastornos neurodegenerativos en años posteriores de no ser controlado e incluso podría convertirse en un problema de salud grave para el futuro.

## INTRODUCCIÓN





La neuroglobina (Ngb) fue descubierta en el año 2000 por Burmester *et al* (1) y recibió su nombre por su localización preferencial a nivel de sistema nervioso. La función exacta de Ngb resultó desconocida al momento de su descubrimiento. Inicialmente se asumió un papel relacionado con la fijación y transporte de oxígeno por su parecido con otras globinas, sin embargo, después de diversos estudios se descubrió que no está directamente relacionada con la preservación de los niveles de oxígeno, sino más bien con la detección o respuesta a las deficiencias de oxígeno como son las condiciones hipóxicas o isquémicas y la subsiguiente reperfusión del tejido o bien la eliminación de especies reactivas nocivas que se acumulan en la célula (11). La hipoxia se define como el transporte y suministro inadecuados de O<sub>2</sub> a los tejidos, puede producirse cuando la presión parcial de O<sub>2</sub> ambiental es limitada, por ejemplo por ondas de calor generadas por cambio climático o tras acontecimientos patológicos como trastornos pulmonares o deficiencias circulatorias (12). La isquemia cerebral o ictus se produce cuando el flujo o irrigación sanguínea se reducen, esto puede deberse a la obstrucción de arterias cerebrales, lo cual puede generar hipoxia e incluso anoxia en la zona afectada. Tanto el ictus como la hipoxia se pueden desarrollar por exposición a gases contaminantes (13). En el caso de la exposición a mayor radiación solar derivada de cambio climático, se ha argumentado que la luz ultravioleta (UV) daña la estructura de enzimas antioxidantes interfiriendo con su actividad; y se teoriza que altera el sitio activo de la enzima permitiéndole interactuar con el hierro libre en el organismo y dar lugar a la formación de radicales libres a través de la reacción de Fenton (14). Derivado de estos breves acontecimientos, a continuación, analizamos a profundidad el impacto del cambio climático sobre la presencia de hipoxia, isquemia y estrés oxidativo y el importante rol de la neuroglobina en estos procesos.

## CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. GLOBINAS

Las proteínas globulares, también llamadas globinas, poseen la capacidad de transporte de oxígeno ( $O_2$ ) a la célula y son esenciales para mantener la producción de Trifosfato de adenosina (ATP) en el proceso conocido como respiración celular que se lleva a cabo a nivel mitocondrial (15). Las globinas contienen un grupo protésico hemo (Fe-protoporfirina IX), mediante el cual puede unirse reversiblemente a ligandos gaseosos como  $O_2$ , CO y NO (7).

Los vertebrados poseen 4 tipos de globinas (**Figura 1**) que difieren en términos de estructura, distribución tisular y función: hemoglobina, mioglobina, citoglobina y neuroglobina. La hemoglobina (Hgb) está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, se une y transporta  $O_2$ , gas no suficientemente soluble en plasma sanguíneo (15, 16). La mioglobina (Mgb), una proteína monomérica que se encuentra en el músculo estriado y cardíaco, y está involucrada en la destoxificación del óxido nítrico (15). La citoglobina (Cgb), también llamada histoglobina, presente en casi todos los tejidos, especialmente en el conectivo y la retina (15, 17), y la neuroglobina (Ngb), constituida por una estructura monomérica expresada sobre todo en células nerviosas (1, 15, 18).

	Hemoglobina	Mioglobina	Citoglobina	Neuroglobina
				
<b>Sitios de expresión.</b>	Glóbulos rojos	Músculo esquelético Corazón Musculo liso	Linajes de fibroblastos Células estrelladas del hígado	Neuronas (SNC, SNP) Retina
<b>Coordinación átomo de hierro.</b>	Penta	Penta	Hexa	Hexa
<b>Afinidad por oxígeno (P50 (O<sub>2</sub>) en torr).</b>	26	1	1	1
<b>Ubicación del gen.</b>	( $\alpha$ )-cluster 16p13 ( $\beta$ )-cluster 11p15	22q13	14q24	17q25

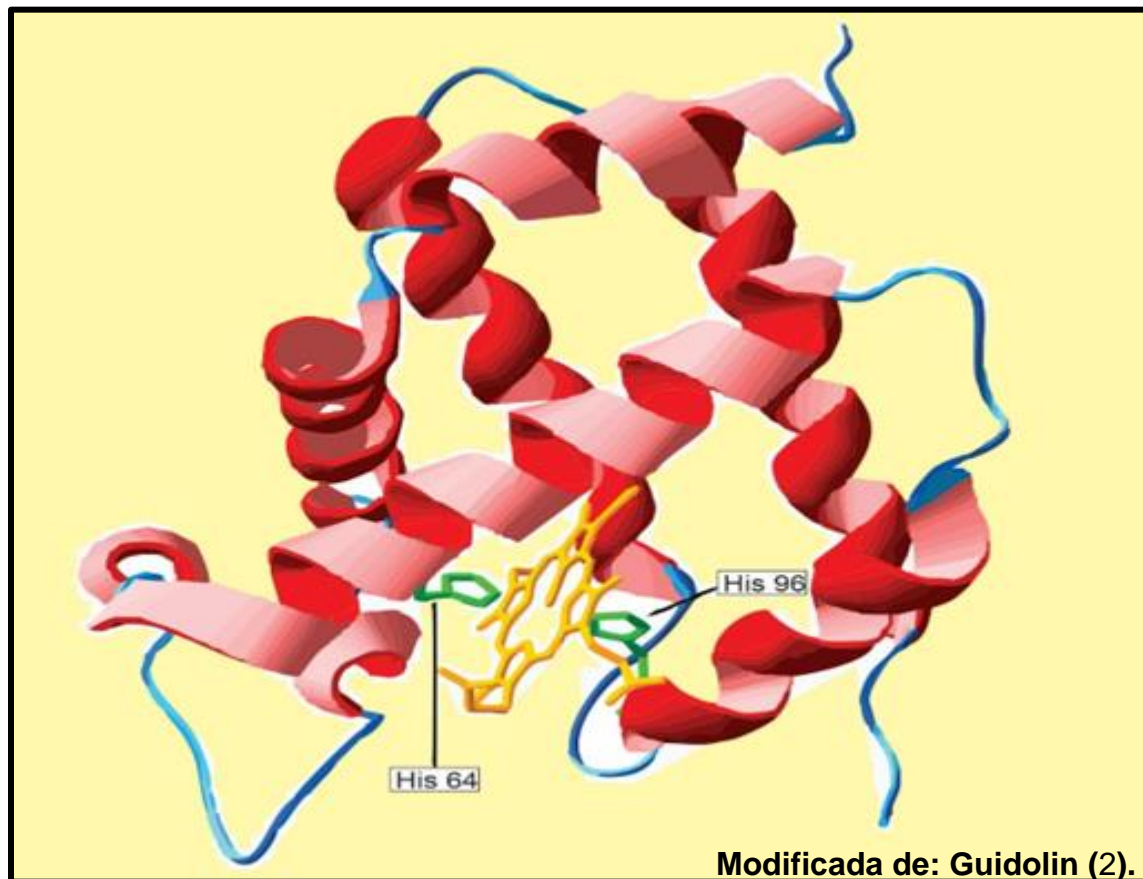
**Modificado de: Hankeln (7).**

**Figura 1. Características de las globinas de vertebrados.** Ngb pertenece a la familia proteica de las globinas, pero difiere en su ubicación y función.

### 1.1.1 NEUROGLOBINA

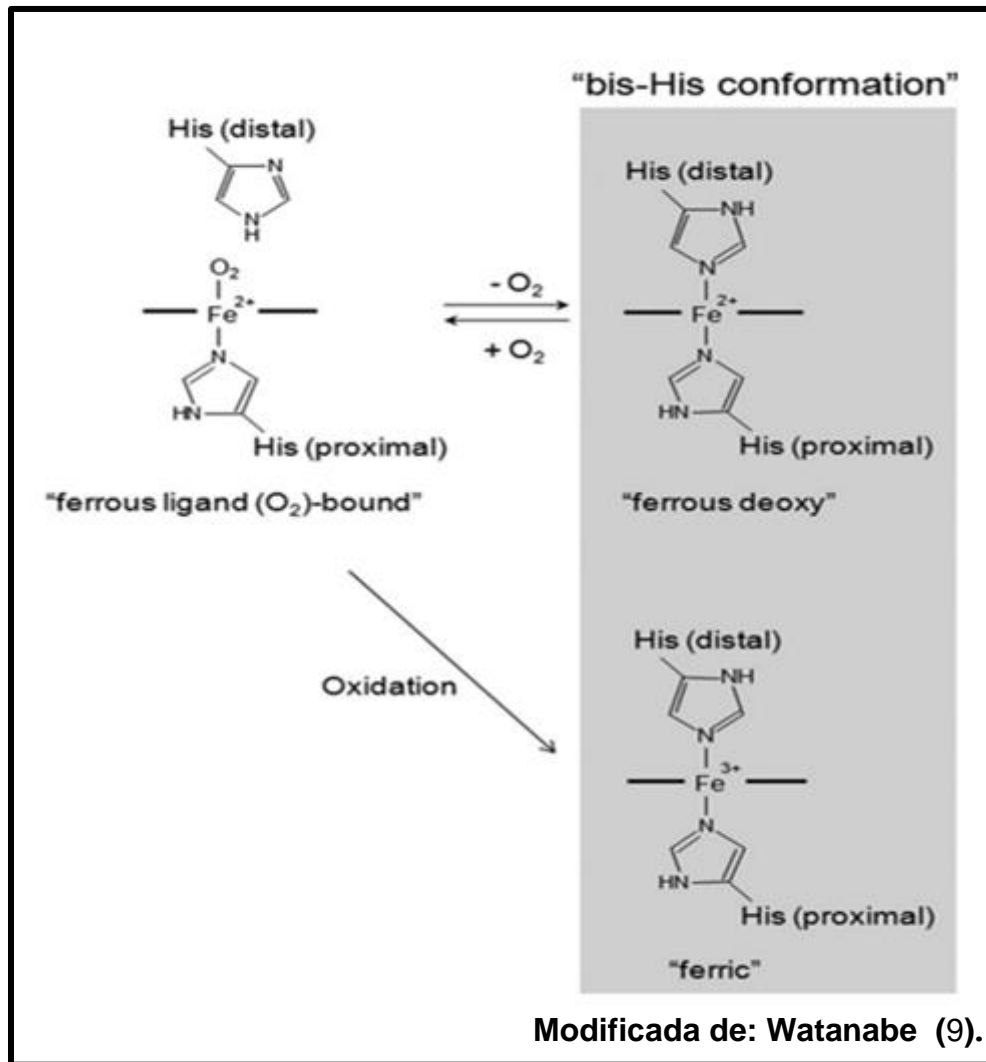
La Ngb recibió su nombre por su localización preferencial en el sistema nervioso, en especial en áreas del cerebro que se han adaptado al estrés fisiológico, como son las neuronas de la corteza cerebral, hipocampo, tálamo, hipotálamo, cerebelo y retina (19). También se encuentra en el sistema nervioso periférico y en páncreas a nivel de islotes de Langerhans. La Ngb se identificó mediante la búsqueda de secuencias parcialmente similares a la globina en bases de datos de secuencias expresadas en ratones y humanos que fueron clonadas y secuenciadas para revelar una proteína de 151 aa con una masa molecular prevista de 17 kDa, que existe como monómero(20), Ngb es estructuralmente similar a la mioglobina y a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la hemoglobina (**Figura 2**); sin embargo, su átomo de hierro del

grupo prostético hemo puede encontrarse en su forma férrica o ferrosa, además, este ion puede hallarse hexacoordinado o pentacoordinado.



**Figura 2. Estructura 3D de Ngb humana.** En verde, se muestran las cadenas de histidina (His 64 e His 96) interactuando con el grupo hemo resaltado en amarillo.

El ion hierro de Ngb se halla principalmente hexacoordinado por una histidina proximal (HisF8 o His-96), cuatro pirroles nitrogenados (del anillo porfirínico) y por último, una histidina distal (HisE7 o His-64) (**Figura 3**) o un ligando externo (21) por lo que la unión del ligando al centro del metal requiere de la disociación del enlace distal (12). Tanto Ngb humana como Ngb murina muestran una identidad de secuencia del 94 % a nivel de aminoácidos, también presentan una homología limitada con otras globinas conocidas. Por ejemplo, hay un 21 % de identidad de secuencia con las mioglobinas de vertebrados y un 25 % de identidad con las hemoglobinas de vertebrados. La Ngb se ha identificado en diferentes mamíferos, aves, reptiles, anfibios y especies de peces (19).



**Figura 3.** Esquema de los grupos hemos en su forma ferrosa-unida a ligando, ferrosa desoxigenada y férrica. El ion hierro del grupo prostético hemo puede encontrarse en su forma férrica o ferrosa, además, este ion puede hallarse hexacoordinado o pentacoordinado.

### 1.1.1.1 Distribución sistémica de la Ngb

La Ngb se encuentra ampliamente expresada tanto en sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico (1). La Ngb humana puede ser encontrada en concentraciones relativamente elevadas dentro de células con actividad metabólica alta y en ciertas células especializadas, como las neuronas del hipotálamo y de la retina, cuyas concentraciones pueden alcanzar hasta 100  $\mu$ M (22). La Ngb se expresa en: bulbo olfatorio, nervio óptico, núcleo del tracto solitario, cerebro (capas corticales IIVI), regiones subcorticales (p. ej. amígdala y tálamo),

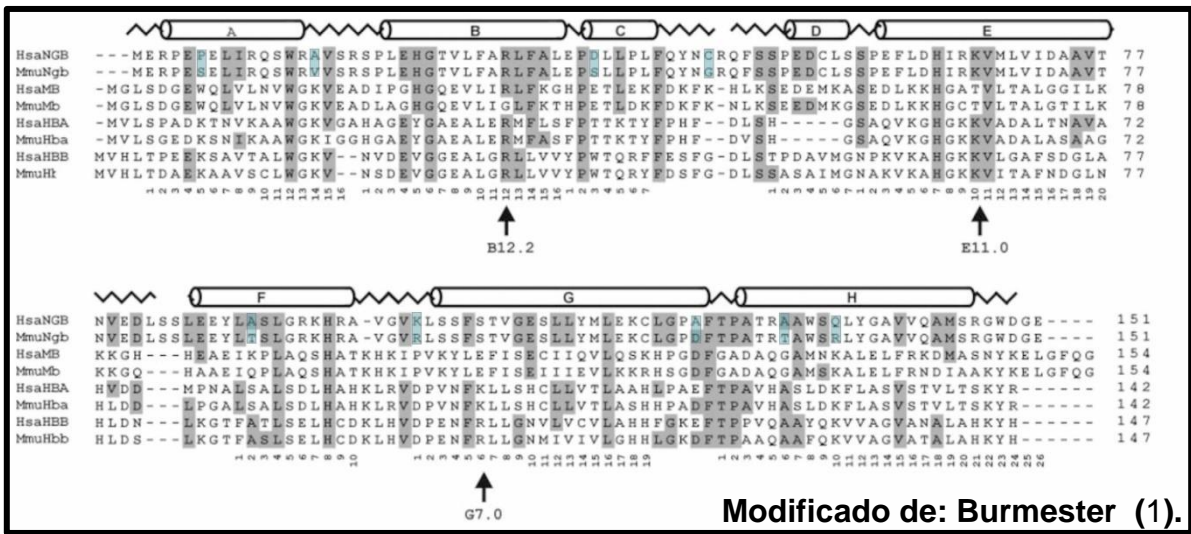
tronco cerebral y cerebelo (21). La Ngb también se expresa en la sustancia gris de la médula espinal, e incluso se ha encontrado mRNA de Ngb en el sistema nervioso periférico, en ganglios autónomos y sensoriales (23-25). Se ha demostrado inmunomarcaje específico a Ngb en sistema nervioso central. En todas las capas corticales del cerebro se encuentra débil inmunorreactividad a Ngb (Ngb-IR). Los núcleos de los nervios craneales del tronco encéfalico han mostrado Ngb-IR, siendo el núcleo hipogloso, vestibular lateral y cerebeloso lateral los que exhibieron marcaje fuerte. Además, se ha demostrado marcaje relativamente fuerte en células de Purkinje de la corteza cerebelosa (21, 26). Ngb no sólo se expresa en el sistema nervioso, sino también se ha encontrado en intestino, tracto gastrointestinal, mamas, tejido endocrino y ovario; sin embargo, no se ha detectado ninguna expresión en hígado, riñón o corazón (27).

#### 1.1.1.2 Distribución intracelular de la Ngb

Estudios recientes han encontrado que, en neuronas, la Ngb se expresa en el citosol, la pared interna de la mitocondria y el núcleo (28-31).

#### 1.1.1.3 Filogenética de la Ngb

La Ngb es una proteína altamente conservada, sólo difiere en el 6 % de las posiciones de aminoácidos en humanos y ratones (32); tan sólo comparte el 25 % de los aminoácidos con las hemoglobinas y mioglobinas de vertebrados, pero se parece a algunas globinas invertebradas específicas de nervios (1). Estos hechos apuntan a una función importante y conservada de Ngb, al menos en vertebrados y posiblemente también en algunos taxones invertebrados (32). Las regiones de codificación de los genes Ngb de mamíferos y peces llevan tres intrones situados en B12.2 (es decir, entre las posiciones de codón 2 y 3 del aminoácido 12 de la hélice B), E11.0 y G7.0 (**Figura 4**). Aunque los intrones B12.2 y G7.0 están también presentes en hemoglobinas y mioglobinas, así como en muchos otros genes de globina, el intrón E11.0 es único para Ngb y puede haber sido adquirido en la evolución temprana del gen (1, 33).



**Figura 4. Comparación de Ngb humana y murina.** Comparación entre la neuroglobina humana y de ratón (HsaNGB y MmuNgb) con las mioglobinas (HsaMB, número de acceso M14603; MmuMb, P04247) y las hemoglobinas a y b (HsaHBA, J00153; HsaHBB, M36640; MmuHba, A45964; MmuHbb, P02088). La estructura secundaria de la hemoglobina humana b está superpuesta en la fila superior. Las  $\alpha$ -hélices se designan de la A a la H, los aminoácidos conservados entre las neuroglobinas y las mioglobinas o hemoglobinas están sombreados. Las posiciones de los intrones en la secuencia Ngb humana (en B12-2, E11-0 y G7-0) se indican con flechas. Los aminoácidos no conservados entre HsaNGB y MmuNgb se encuentran sombreados en azul.

### 1.1.2 FUNCIONES DE LA NEUROGLOBINA

Ciertamente, la función exacta de la Ngb resultó desconocida al momento de su descubrimiento, inicialmente se asumió un papel relacionado con la fijación y transporte de oxígeno por su parecido con otras globinas como lo señalan algunos estudios *in vitro*, los cuales concluyeron que Ngb era una proteína hemo fijadora de oxígeno que se expresa preferentemente en neuronas cerebrales y es inducida por hipoxia neuronal e isquemia cerebral (20). Sin embargo, a diferencia de otras globinas como Hgb y Mgb que están construidas estructuralmente para soportar el transporte y almacenamiento de  $O_2$ , Ngb se caracteriza únicamente por una afinidad moderada de unión al  $O_2$  en condiciones fisiológicas ( $P_{50} = 7.5$  Torr a  $37^\circ C$  y pH neutro) (34). Se puede destacar que, debido a la alta tasa metabólica de las neuronas, estas están obligadas a experimentar niveles de  $P_{50}$  celular cerca de cero, lo que significa que en condiciones *in vivo* la saturación fraccional de  $O_2$  de

Ngb en los vertebrados sería demasiado baja para desempeñar un papel en el transporte o almacenamiento de O<sub>2</sub> (34). Además, la concentración relativamente baja de Ngb en algunas áreas del cerebro ( $\pm 1 \mu\text{M}$ ) proporciona solo una capacidad limitada de Ngb para unir, transportar o almacenar moléculas de O<sub>2</sub> (1, 21).

Estos hechos suponen que las funciones fisiológicas de Ngb podrían no estar relacionadas a la preservación del nivel de oxígeno, sino más bien a desarrollar un papel de detección o respuesta a las deficiencias de oxígeno como las condiciones hipóxicas o isquémicas y la subsiguiente reperusión del tejido o bien la eliminación de especies reactivas nocivas que se acumulan en la célula (11). Esta cualidad de ser inducible a diferentes estímulos adversos para la célula motivó el interés de los investigadores para identificarla como un agente neuroprotector.

**Tabla 1.** Resumen de los efectos de la modulación del nivel de neuroglobina en el cerebro.

Patología o Lesión	Niveles de Ngb	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Efecto	Referencia
Hipoxia	Sobreexpresado	Neuronas corticales y del hipocampo de ratas	–	Prevención de muerte neuronal	(35)
Hipoxia	Sobreexpresado	Neuronas primarias de ratón	–	Atenuación de la agregación mitocondrial y reducción de la muerte neuronal	(36)
Hipoxia y estrés oxidativo	Sobreexpresado	Células de neuroblastoma humano SH- SY5Y	–	Papel neuroprotector	(37, 38)
Lesión por hipoxia y reoxigenación	Sobreexpresado	Neuronas primarias de ratón	–	Mejoramiento de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el agotamiento de ATP	(39)
Hipoxia y estrés oxidativo	Regulado a la baja	Neuronas corticales de ratón	–	Aumento de vulnerabilidad al daño	(40)

Privación de glucosa en oxígeno (OGD)/reoxigenación	Sobreexpresado	Neuronas primarias de ratón	–	Disminución de la producción de ROS/RNS y neurotoxicidad	(41)
Lesión por isquemia-reperfusión	Sobreexpresado	–	Ratones modelo de isquemia	Mejoramiento del daño neuronal	(42)
Humo de combustión	Sobreexpresado	–	Ratones transgénicos	Preservación de la respiración mitocondrial, atenuación del daño oxidativo del ADN, cambios inflamatorios persistentes y déficits neuroconductuales	(43)
Infarto cerebral	Sobreexpresado	–	Ratones transgénicos	Reducción del tamaño del infarto cerebral	(28, 44)
(ion 1-metil-4-fenilpiridinio) MPP +	Sobreexpresado	Células de neuroblastoma humano SK-N-BE2	–	Preservación de la actividad del complejo IV mitocondrial e inhibición de la fragmentación mitocondrial	(39)
Toxicidad por $\beta$ -amiloide (Enfermedad de Alzheimer)	Sobreexpresado	Neuronas corticales de ratón	Ratones transgénicos	Prevención contra la neurotoxicidad inducida por $\beta$ -amiloide y el inicio de la DA	(45, 46)
Enfermedad de Parkinson	Sobreexpresado	Células de Neuroglioma Humano	–	Protección contra la formación de inclusiones $\alpha$ Syn	(47)
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	Regulado a la baja	–	Modelo de ratón de mutante SOD G93A	Alteración del fenotipo mitocondrial normal, Aumento de la disfunción neuromotora	(48)

Regulado a la baja	Células ganglionares primarias de la retina de rata	–	Degeneración de las células ganglionares y deterioro de la función visual	(49)
--------------------	-----------------------------------------------------	---	---------------------------------------------------------------------------	------

**Modificada de: Fiocchetti (50).**

### 1.1.2.1 Función antiapoptótica

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada en la cual se activan mecanismos intracelulares dependientes de energía que llevan a la degradación regulada de la célula, que, más tarde, es eliminada por células fagocíticas sin desencadenar reacción inflamatoria (51-53). La apoptosis se considera un componente vital de varios procesos, incluido el recambio celular normal, el desarrollo y funcionamiento adecuado del sistema inmunitario, desarrollo embrionario y muerte celular inducida por sustancias químicas. Una apoptosis inapropiada (ya sea muy poco o demasiado) es un factor en muchas condiciones humanas, incluidas las enfermedades neurodegenerativas, el daño isquémico, los trastornos autoinmunes y muchos tipos de cáncer (54).

Morfológicamente, la presencia de apoptosis causa en la célula encogimiento y picnosis (contracción del núcleo celular), esto se caracteriza por la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina y la compactación del citoplasma, esto provoca además que las células se desprendan de los tejidos circundantes y se separen en fragmentos celulares con el citoplasma incrustado con organelos estrechamente empaquetados. A continuación, estos cuerpos compactos denominados cuerpos apoptóticos asumen el proceso de brotación. Finalmente, la liberación de marcadores de la superficie celular (fosfatidilserina) de la membrana celular potencian algunas células como macrófagos para fagocitar estos cuerpos para una mayor degradación y también para prevenir la necrosis secundaria (55, 56); bioquímicamente hablando, el proceso de ejecución apoptótico parece depender de las caspasas (cisteínas proteasas responsables de la escisión de residuos aspárticos tras su activación). Se trata de un proceso liderado por proenzimas inactivas que una vez activadas tienden a activar otras pro-caspasas para iniciar una cascada de proteasas y la ejecución de una serie de procesos de muerte celular (57). Estos procesos bioquímicos y morfológicos se llevan a cabo a

través de dos vías celulares conocidas como la vía intrínseca o vías extrínsecas (58).

#### 1.1.2.1.1 Vía intrínseca mitocondrial

Esta vía involucra una serie de eventos intracelulares que ocurren dentro de las mitocondrias. Una serie de factores como hormonas, factores de crecimiento, radiación, toxinas, hipoxia, infecciones virales e hipertermia que conducen a la permeabilidad intermembranal de las mitocondrias que conducen a la liberación de proteínas proapoptóticas a través de las intermembranas hacia el citosol (59, 60), en otras palabras, se produce la liberación de proteínas mitocondriales hacia el citosol. Algunas de estas proteínas liberadas activan una cascada proteolítica de caspasas en el citoplasma que desencadena la apoptosis (61). Una proteína crucial que se libera de las mitocondrias en la vía intrínseca es el citocromo c (Cyt-c), un componente de la cadena de transporte de electrones soluble en agua. Cuando es liberado al citosol desempeña una función totalmente diferente: se une a Apaf-1 (proteína adaptadora/activadora de procaspasas) y caspasa 9 para formar un complejo heptamérico llamado "apoptosoma", en el cual las proteínas Apaf-1 reclutan moléculas de procaspasa iniciadora (procaspasa-9), que se activan por su estrecha cercanía en el apoptosoma, del mismo modo que se activan moléculas de procaspasa-8 y procaspasa-10. Después, las moléculas de caspasa-9 activadas proceden a activar a las siguientes procaspasas ejecutoras de la cadena induciendo la apoptosis (61-63).

#### 1.1.2.1.2 Ngb y control de la apoptosis

Las células del sistema nervioso tienen una capacidad de regeneración extremadamente limitada a diferencia de otros tipos celulares, por lo tanto, es necesario que estas células no sufran una apoptosis "accidental" (64), es decir, que inicien la cascada apoptótica en condiciones que no garanticen la muerte celular programada (10). Esta podría ser la razón de la elevada presencia de Ngb dentro de su citosol. En este caso, las pequeñas liberaciones "accidentales" de Cyt-c que de otro modo iniciarían la apoptosis serán rápidamente secuestradas por Ngb y se evitará el desarrollo de la cascada apoptótica (10).

Se le han atribuido algunas funciones antiapoptóticas a Ngb relacionadas con la vía intrínseca de la apoptosis, ya que se ha observado que actúa sobre mecanismos mitocondriales relacionados con la formación del apoptosoma (19), la activación de la vía PI3K / Akt (27) y la eliminación de agregados de proteínas (65).

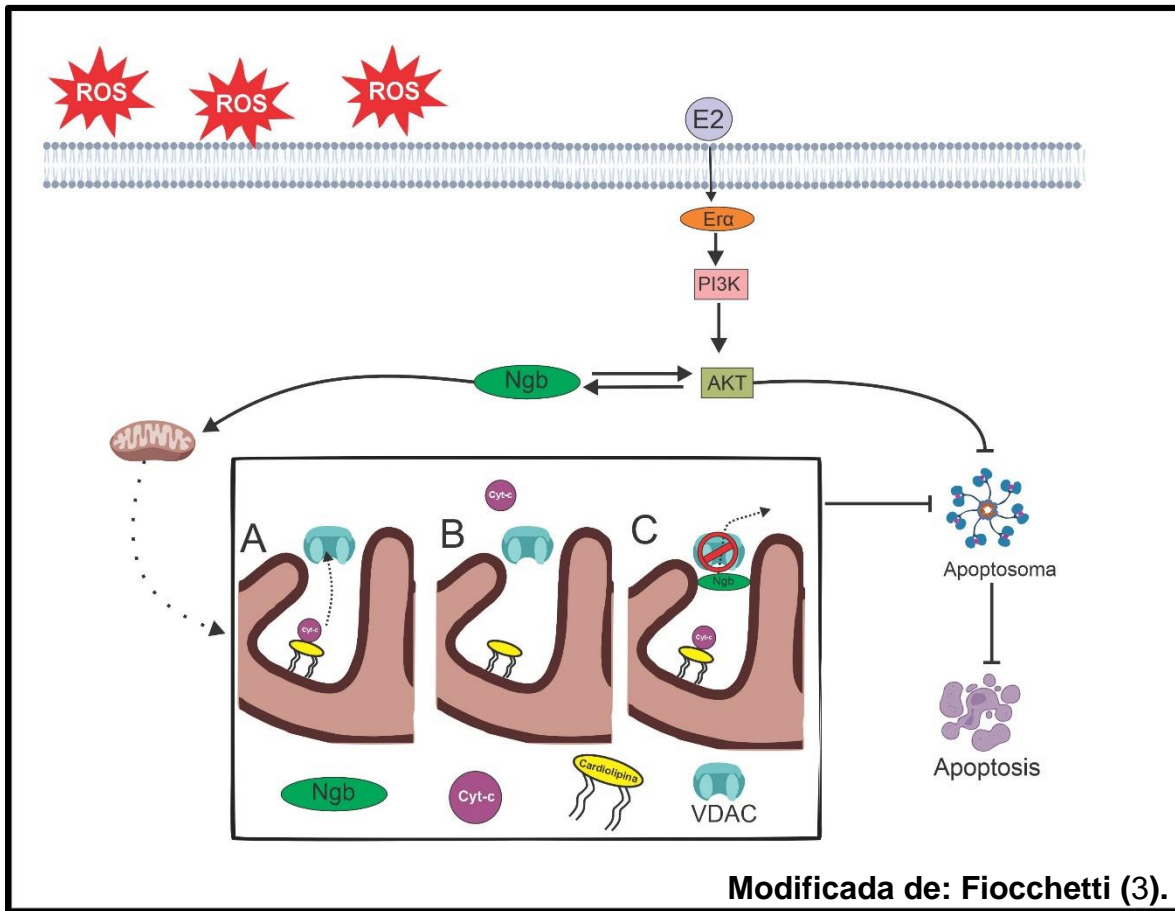
Algunos estudios han utilizado modelos computacionales para determinar el mecanismo de Ngb en la muerte celular (10). Los datos obtenidos mediante el modelado computacional sugieren que la Ngb reduce la formación del apoptosoma, causando el bloqueo de la activación del iniciador pro-caspasa 9 y así bloquea significativamente el desencadenamiento de la apoptosis (66). Y se ha simulado la interacción entre Ngb y Cyt-c y validando resultados utilizando estudios *in vitro* (10).

A nivel neuronal Ngb figura entre las proteínas que regulan la apoptosis (67) al participar en una rápida reacción redox entre Ngb reducida (ferrosa) y el citocromo (férrico) oxidado, tanto en células nerviosas como en células cancerosas no nerviosas (27, 31, 68, 69).

El estrés intracelular (estrés oxidativo y estrés nitrosativo) y extracelular causan la pérdida de integridad de la membrana mitocondrial y la liberación de Cyt-c de la cardiolipina (fosfolípido de la membrana mitocondrial interna) (70). La localización mitocondrial de Ngb, inducida por estrógenos (E2), hace que Ngb se una a Cyt-c libre evitando su liberación en el citosol y la consiguiente formación de apoptosomas (29, 45, 68, 71), de esta forma se evita el desarrollo de la cascada apoptótica.

Mecánicamente, se ha propuesto que Ngb podría favorecer la progresión del fenotipo maligno de glioma preservando las células cancerosas de la apoptosis contra la presión oxidante mediante la regulación directa de la vía antiapoptótica PI3K/AKT (

**Figura 5)** (72, 73).

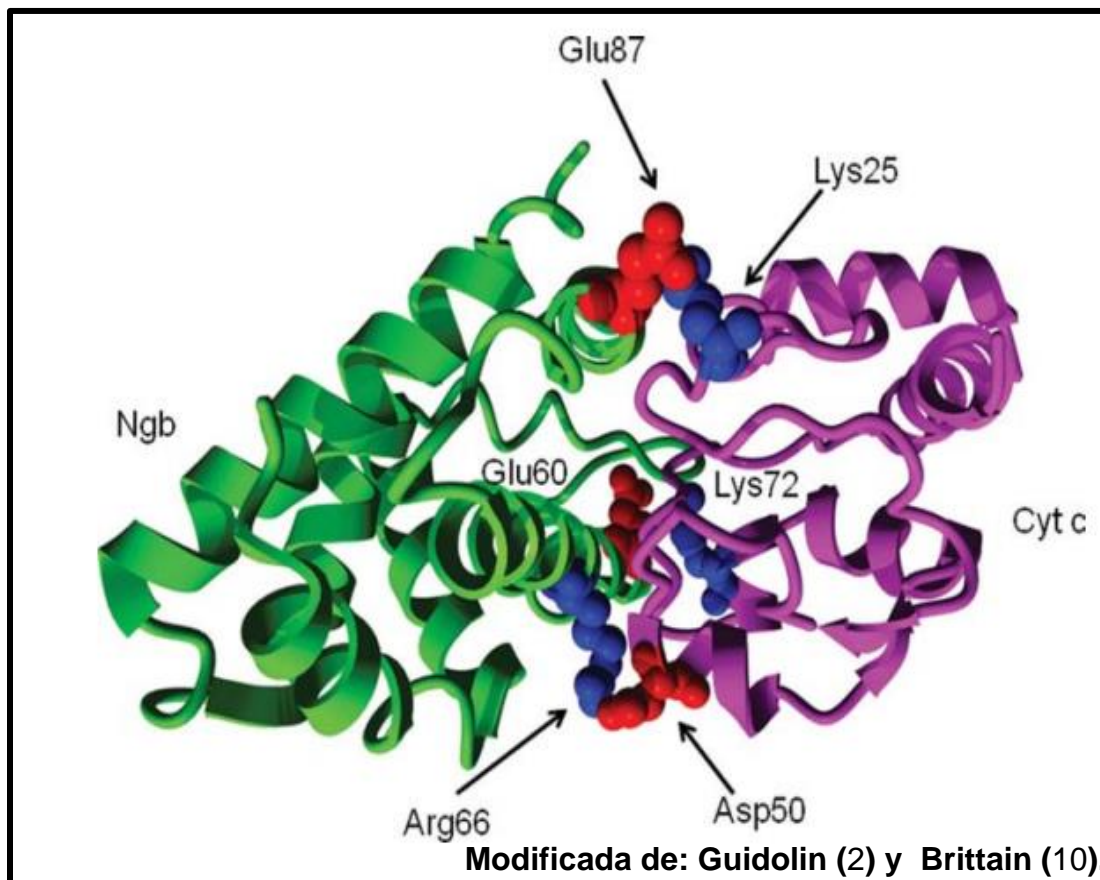


**Figura 5. Mecanismos de actividad antiapoptótica de NgB.** Modelo esquemático de la vía activada intracelular E2 que afecta los niveles de expresión/localización intracelular de NgB y el papel anti apoptótico relacionado tanto de NgB mitocondrial como de AKT que parece estar doblemente vinculado con la función de NgB. E2: 17β-estradiol; ERα: receptor de estrógenos α; PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa, Cyt-c: citocromo c.. A) Cyt-c es liberado al citosol. B) NgB se une a Cyt-c e impide su liberación. C) NgB modula la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Los estudios de resonancia de plasmón superficial indican que el paso inicial de la reacción entre NgB y Cyt-c produce un complejo débilmente unido con una constante de equilibrio en la región de 200 IM, que es sensible tanto a la fuerza iónica como a la temperatura (74).

Un cálculo basado en la diferencia de potencial redox entre las dos proteínas, sugiere que el segundo paso de la reacción y la transferencia de electrones contribuye significativamente a la reacción favorable global. Sin embargo, a falta de

determinaciones estructurales directas del complejo formado en la reacción de Ngb con Cyt-c, se han utilizado métodos computacionales para comprender mejor esta reacción (74). Los estudios computacionales sugieren que la Ngb no forma una estructura acoplada única con el Cyt-c, sino, al igual que otros pares de proteínas redox bien caracterizados, forman un conjunto de complejos estrechamente relacionados estructuralmente los cuales se acoplan utilizando una superficie común (10). Un hallazgo interesante (ver **Figura 6**) sugiere que los residuos de la interfaz Glu60 y Glu87 en Ngb se une a los residuos, Lys72 y Lys25, en Cyt-C, que son obligatorios para la unión de Cyt-c a APAF1, una proteína formadora de apoptosoma clave (45, 75). Sin embargo, hasta ahora estas interacciones de aminoácidos no han sido validados experimentalmente.



**Figura 6. Estructura tridimensional predicha mediante estudios de acoplamiento entre Ngb y Cyt-c.** El complejo proteico formado inhabilita la disponibilidad de los residuos de aminoácidos de Cyt-c necesarios para unirse a APAF1 y formar el apoptosoma.

Por otra parte, otro posible mecanismo antiapoptótico sugiere una interacción entre Ngb y VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), el cual es un sitio de contacto entre las membranas internas y externas a nivel mitocondrial y permite la liberación de manera selectiva de factores mitocondriales en el citosol (2). En particular, la configuración prevista del complejo Ngb-VDAC implica la formación de una interfaz al nivel de la apertura del canal, lo cual abre la posibilidad para que Ngb module directamente la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa (76, 77).

Se han proporcionado datos experimentales consistentes con este mecanismo en neuronas corticales de ratón cultivadas después de la privación de oxígeno y glucosa (OGD) (78). Los resultados indicaron que la unión entre Ngb y VDAC aumentaron después de OGD en comparación con la normoxia. Además, la sobreexpresión de Ngb redujo significativamente los marcadores de apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial inducida por OGD, mientras que el bloqueo en la expresión de esta proteína mostro un aumento de la muerte neuronal apoptótica inducida por OGD (2, 78).

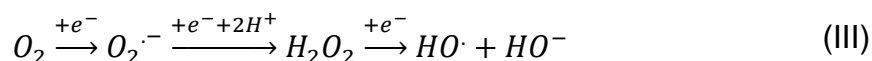
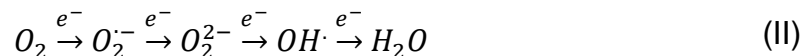
### 1.1.2.2 Función antioxidante

La conversión de energía es uno de los procesos fundamentales de la vida, su mecanismo básico requiere de reacciones de reducción-oxidación “redox” a nivel mitocondrial en las que los electrones pasan en cadena desde un primer donante (alimentos y sus productos transformados) a diferentes complejos enzimáticos intermediarios como los complejos de la cadena respiratoria (CI, CII, CIII, CIV, CV) hasta un aceptor final, el  $O_2$  (79).



De manera normal, el  $O_2$  acepta cuatro electrones y cuatro protones para producir dos moléculas de agua a través de una reducción univalente secuencial de cuatro pasos (80) como se aprecia en la reacción (I) pero cuando ocurre una reducción parcial del  $O_2$  como se aprecia en la reacción (II) y (III) se producen algunas especies como anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) (81, 82), los cuales son potencialmente peligrosas porque causan

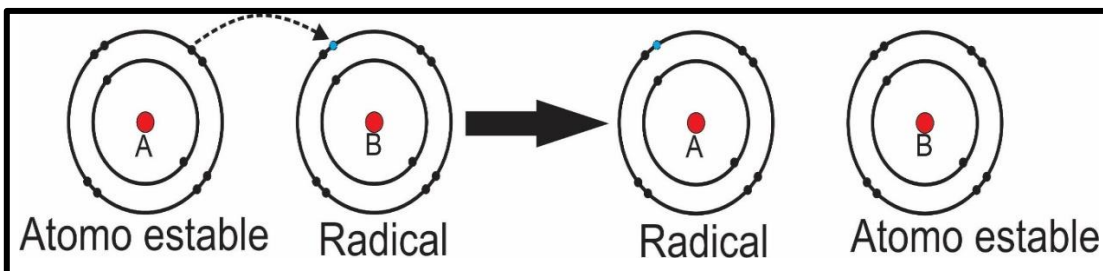
reacciones en cadena al robar o donar electrones a otras especies químicas generalmente unidas por enlaces débiles para llegar a una configuración más estable o pareada (83).



Aunque termodinámicamente se ve favorecida la reacción del  $O_2$  con donantes orgánicos de electrones se ve impedida cinéticamente por el estado básico triplete del  $O_2$ . Por lo tanto, la reacción (I) puede ser bien controlada de tal manera que ocurra poca reducción parcial (82).

#### 1.1.2.2.1 Especies reactivas y radicales libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan electrones desapareados en el orbital externo (cada orbital puede albergar un máximo de dos electrones) (84, 85). Debido a que los electrones son más estables cuando están apareados en los orbitales, los radicales libres son reactivos frente a otras especies. Los electrones no apareados tienen una fuerte tendencia a formar pares de electrones para llegar a una configuración más estable. Un radical puede donar su electrón desapareado a otra molécula, o puede robar un electrón de otra para formar un par electrónico. No obstante, si un radical toma un electrón de otra molécula o dona un electrón, la otra molécula se transforma en un radical libre (**Figura 7**). Entonces, una característica de los radicales libres es su tendencia a causar reacciones en cadena: un radical genera otro radical y así sucesivamente (83).



**Figura 7. Reacción en cadena de formación de radicales libres por otro radical.** Un radical libre B extrae un electrón del átomo A para estabilizar su estructura química, al mismo tiempo el átomo A, antes estable, se convierte en un radical libre.

Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicalarias, pero pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes denominado especies reactivas del oxígeno (ROS) (86, 87), este término se refiere a un grupo de moléculas que contienen oxígeno con propiedades reactivas. Se les considera como metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos que poseen una fuerte capacidad oxidante (88). Del mismo modo, el término RNS se refiere a un grupo de moléculas conteniendo nitrógeno con reactividad química (89).

**Tabla 2. Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno.**

<b>Especies reactivas del oxígeno ROS</b>				
<b>Radicales</b>				
	Superóxido:	$O_2^{\cdot -}$	Radical alcoxilo:	$RO^{\cdot}$
	Hidroxilo:	$OH^{\cdot}$	Radical peroxilo:	$ROO^{\cdot}$
<b>No radicales</b>				
	Peróxido de hidrógeno:	$H_2O_2$	Ozono:	$O_3$
	Oxígeno singulete:	$^1O_2$	Peróxido orgánico:	$ROOH$
	Acido hipocloroso:	$HOCl$	Ácido hipobromoso:	$HOBr$
<b>Especies reactivas del nitrógeno RNS</b>				
<b>Radicales</b>				

No radicales	Óxido nítrico:	NO	Dióxido de nitrógeno:	NO <sub>2</sub>
	Peroxinitrito	ONOO <sup>-</sup>	Catión nitrosilo:	NO <sup>+</sup>
	Trióxido de dinitrógeno	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Anión nitroxilo:	NO <sup>-</sup>
	Tetraóxido de dinitrógeno	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Ácido peroxinitroso:	ONOOH
	Ácido nitroso	HNO <sub>2</sub>	Peroxinitritos alquílicos:	ROONO

**Modificada de: Phaniendra (90).**

Las ROS/RNS se producen de forma enzimática (por ejemplo, en los macrófagos para matar a los invasores) o no enzimática, como reacción secundaria. Este último, es el caso de la cadena respiratoria que se lleva a cabo en la mitocondria y que constituye la ruta de generación de especies ROS más importante en el organismo, en esta ruta la mayor parte del oxígeno se reduce a moléculas de agua por la acción de una enzima denominada citocromo C oxidasa (

**Figura 10)**, sin embargo, una pequeña proporción de las moléculas de oxígeno (1-2%) se convierten en anión radical superóxido (91), que en un ambiente biológico, es transformado enzimáticamente a peróxido de hidrógeno, a partir de la enzima superóxido dismutasa; y posteriormente, considerando la presencia de metales en el organismo como el Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>+</sup> a través de la reacción de Fenton [reacción (XI)] (92).

**Tabla 3.** *Especies reactivas y su origen en el organismo.*

Especie reactiva	Símbolo	Vida media (s)	Origen y reactividad
Superóxido	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	10 <sup>-4</sup>	Producto metabólico de la fosforilación oxidativa generado en la mitocondria, sistema vascular, entre otros.

Radical hidroxilo	OH <sup>•</sup>	10 <sup>-9</sup>	Altamente reactivo, generado durante la sobrecarga de hierro y diversas reacciones en el organismo.
Peróxido de hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Estable	Generado en el organismo como producto de la reacción O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> catalizada por superóxido dismutasa y a través de un gran número de reacciones.
Radical peroxilo	•OOR	Rango de los segundos	Formado como producto del daño oxidativo a lípidos, ADN y carbohidratos.
Hidroperóxido orgánico	ROOH	Estable	Producto del daño oxidativo a lípidos, ADN y carbohidratos; puede reaccionar con metales de transición y formar nuevos radicales.
Oxígeno singlete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	10 <sup>-6</sup>	Altamente reactivo, formado durante la fotosensibilización y reacciones químicas.
Ozono	O <sub>3</sub>	Rango de los segundos	Presente en la atmósfera, puede reaccionar con diversas moléculas.

---

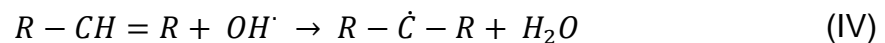
**Traducida de: Mustafa (93).**

La acumulación de niveles demasiado altos de ROS/RNS en el organismo es peligrosa y se conoce como estrés oxidativo (82), esta condición provoca daño celular sobre diferentes macromoléculas como son:

1. **Lípidos.** Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (94-96).

2. **Proteínas.** Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos (85).
3. **Ácido desoxirribonucleico (ADN).** Ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis). Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN (97-100).

La reacción (IV) muestra el daño biológico causado por  $\text{OH}^\cdot$  conocido como peroxidación lipídica. Esto ocurre cuando el  $\text{OH}^\cdot$  se genera cerca de membranas y para estabilizarse obtiene electrones de las cadenas laterales de los ácidos grasos insaturados (101).



Los radicales libres presentan varios mecanismo de reacción, (4) entre los cuales se encuentran:

- a) Reacciones de donación y aceptación de electrones entre las especies químicas a través de radicales reductores o radicales oxidantes (102).



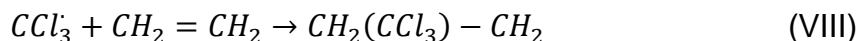
- b) Extracción de hidrógeno; en el cual se genera inestabilidad en los enlaces de una molécula al eliminar un átomo de hidrogeno (102).



c) Reacciones de autoaniquilación; en la que los radicales se aparean con otros y estabilizan su estructura (102).

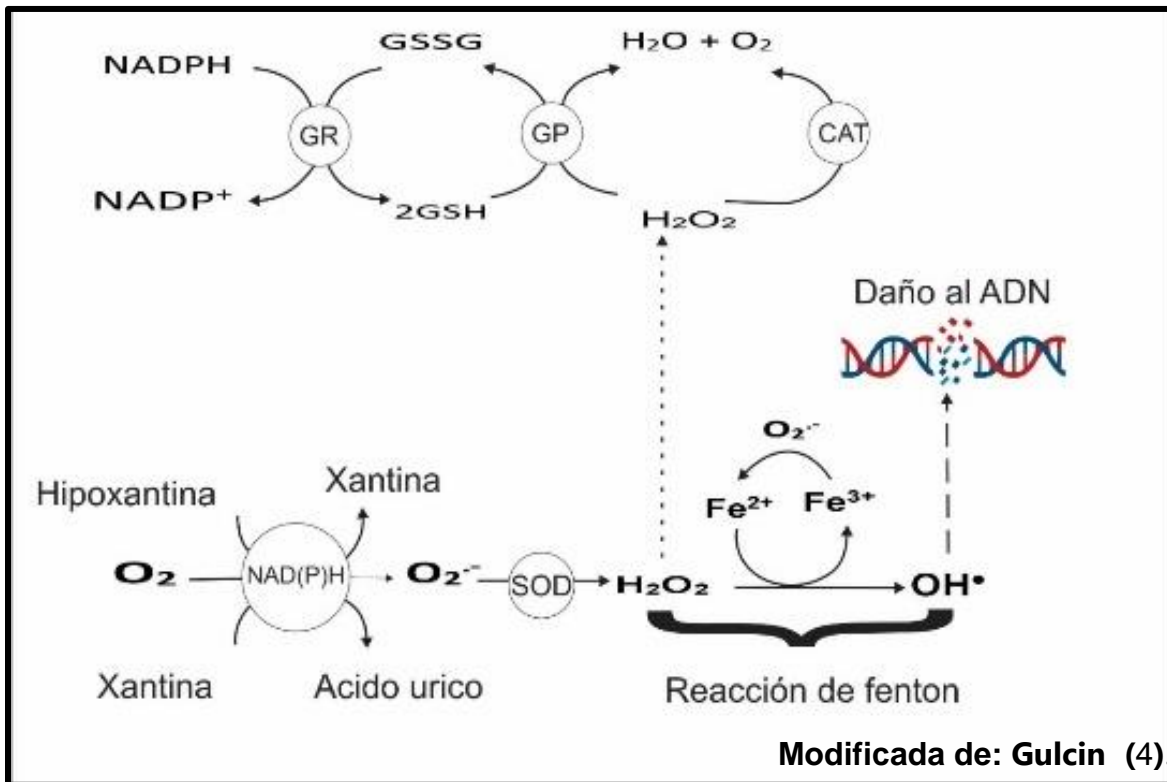


d) Reacciones de adición; en las que los radicales se unen a la estructura principal de una molécula insaturada (102).



#### 1.1.2.2.2 Ngb y sistemas antioxidantes

La acumulación de ROS puede producirse tanto por una sobreproducción como por una eliminación insuficiente (82). Esta eliminación suele llevarse a cabo mediante la acción de moléculas llamadas antioxidantes, las cuales al estar presentes en concentraciones bajas comparadas con las de un sustrato oxidable, retrasan o inhiben significativamente la oxidación del sustrato (103). Debido a que la actividad metabólica es constante, la producción de ROS y RNS también lo es, por ello, existen enzimas antioxidantes (**Figura 8**) que se encargan de controlar sus niveles en el organismo como superóxido dismutasa (SOD); la cual cataliza la dismutación de superóxido en  $O_2$  y  $H_2O_2$  (104) , catalasa (CAT); que cataliza la descomposición de  $H_2O_2$  hacia oxígeno y agua (105) o enzima glutatión peroxidasa (GPx) que elimina  $H_2O_2$  mediante oxidación de glutatión (106).



**Figura 8. Enzimas antioxidantes y sus reacciones.** Enzima superóxido dismutasa SOD, enzima catalasa CAT, GR glutatión reductasa, GP glutatión peroxidasa.

Algunos estudios sugieren que Ngb presenta actividad antioxidante vinculada a mecanismo de acción como: a) asociación con la vía antioxidante NRF-2 (6), b) concentración subnanomolar de Ngb extracelular (107) y c) inhibición de la cadena respiratoria (108).

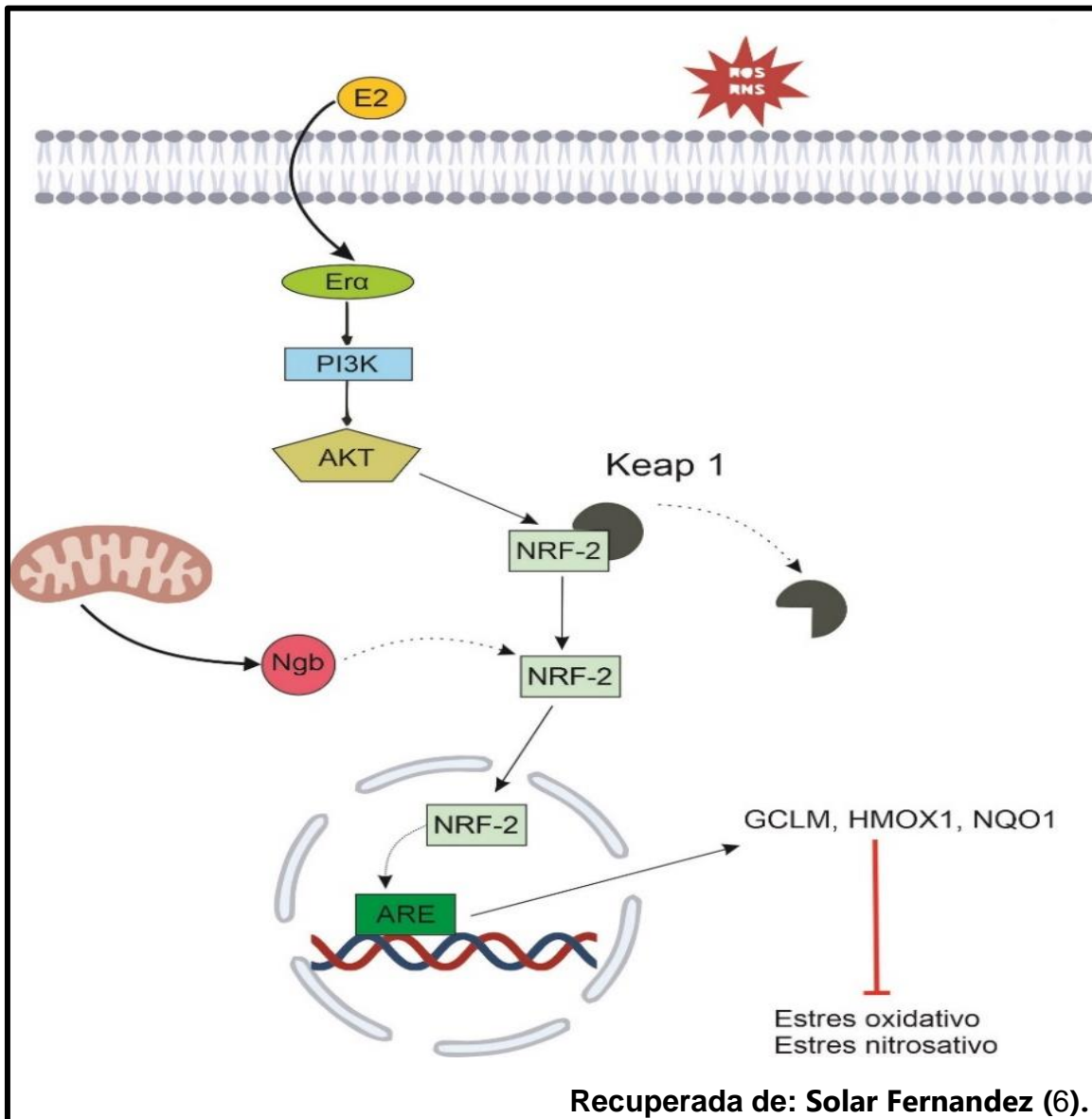
### 1.1.2.2.3 Asociación con NRF2

El factor nuclear NRF-2 actúa como el principal regulador de la respuesta celular frente al estrés oxidativo endógeno y exógeno (109-111). NRF-2 es un factor de transcripción citosólico que se inactiva constantemente a través de su unión con la proteína Kelch asociado a ECH (Keap1), pero en presencia de estrés oxidativo o de fármacos NRF-2 se desprende de su inhibidor para translocarse al núcleo donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) del ADN, impulsando la expresión de los genes que codifican proteínas involucradas en la desintoxicación celular de especies reactivas (p. ej., modificador de glutamato-cisteína ligasa (GCLM), hemooxigenasa (deciclado) 1 (HMOX1) y NADPH: quinona oxidoreductasa 1

(NQO1) (109, 112) y así aumentar la tolerancia celular al estrés oxidativo (109-111).

Un estudio realizado sobre células cancerosas de mama MCF-7 identificó la relación entre Ngb y la inducción de la vía antioxidante NRF-2 asociada a hormona esteroidea  $17\beta$ -Estradiol (E2) activando el receptor de estrógenos  $\alpha$ (ER $\alpha$ ) como una respuesta celular dedicada al aumento de la tolerancia de células cancerosas a la acción de ROS y como consecuencia, la supervivencia celular (6). Los resultados de este estudio mostraron una disminución en la activación de la vía antioxidante NRF-2 por parte de las células cuya expresión de Ngb fue inhibida en comparación con el grupo control, demostrando así que la regulación de Ngb es uno de los mecanismos desencadenados por el complejo E2/ER $\alpha$  para proteger las células de cáncer de mama contra el estrés oxidativo (

**Figura 9)** además de evitar, a nivel mitocondrial, el desencadenamiento de la cascada apoptótica (descrita anteriormente) (31, 70, 113).



**Figura 9. Representación esquemática de la actividad antioxidante de Ngb.** La vía de activación intracelular de E2 que afecta tanto a los niveles de expresión como a la localización intracelular de NGB y la localización intracelular, y la vía NRF-2, que describen cómo se entrecruzan dentro de las células del cáncer de mama y afectan al estrés oxidativo.

#### 1.1.2.2.4 Concentración subnanomolar de Ngb extracelular

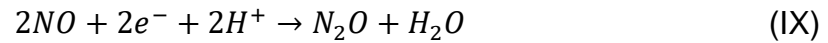
Aunque la mayor parte de la participación de Ngb en la respuesta al estrés oxidativo se centra en el contenido intracelular, algunos datos reportados proponen un efecto de la concentración subnanomolar de Ngb extracelular sobre la regulación de la

función celular, en términos de citoprotección y modulación de la respuesta antioxidante (107). En particular, se ha demostrado que la concentración subnanomolar de Ngb extracelular en astrocitos contrarresta la acción inhibitoria del  $H_2O_2$  ante AKT, favoreciendo su fosforilación (107). Lo anterior se lleva a cabo a través de la activación de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) (114-116) para generar segundos mensajeros (PI 3,4, P2 y PIP3) (117, 118) que activan a la proteína AKT, la cual es fundamental en la regulación del metabolismo, supervivencia, motilidad, transcripción y progresión del ciclo celular (3, 107, 119, 120). Otro efecto de la activación de la vía AKT es la regulación de la actividad del factor de transcripción FoxO3a responsable del incremento de la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes endógenas SOD y CAT, contrarrestando con ello el estrés oxidativo celular (121, 122). Tales resultados abren la fascinante posibilidad de que, en el tejido canceroso, como en el cerebro, la función de Ngb en la respuesta celular de adaptación al estrés oxidativo podría no ser restringida al entorno intracelular, sino también diseminada al microambiente extracelular. En este contexto, la Ngb sobreproducida en células cancerosas por moduladores endógenos (p. ej., E2) o condiciones de estrés (p. ej.,  $H_2O_2$ ) puede ser, bajo circunstancias apropiadas, entregado fuera de las células. Sin embargo, se necesitan más estudios para respaldar adecuadamente tal hipótesis y comprender mejor el posible mecanismo de acción de Ngb fuera de las células (3).

#### 1.1.2.2.5 Inhibición de la cadena respiratoria

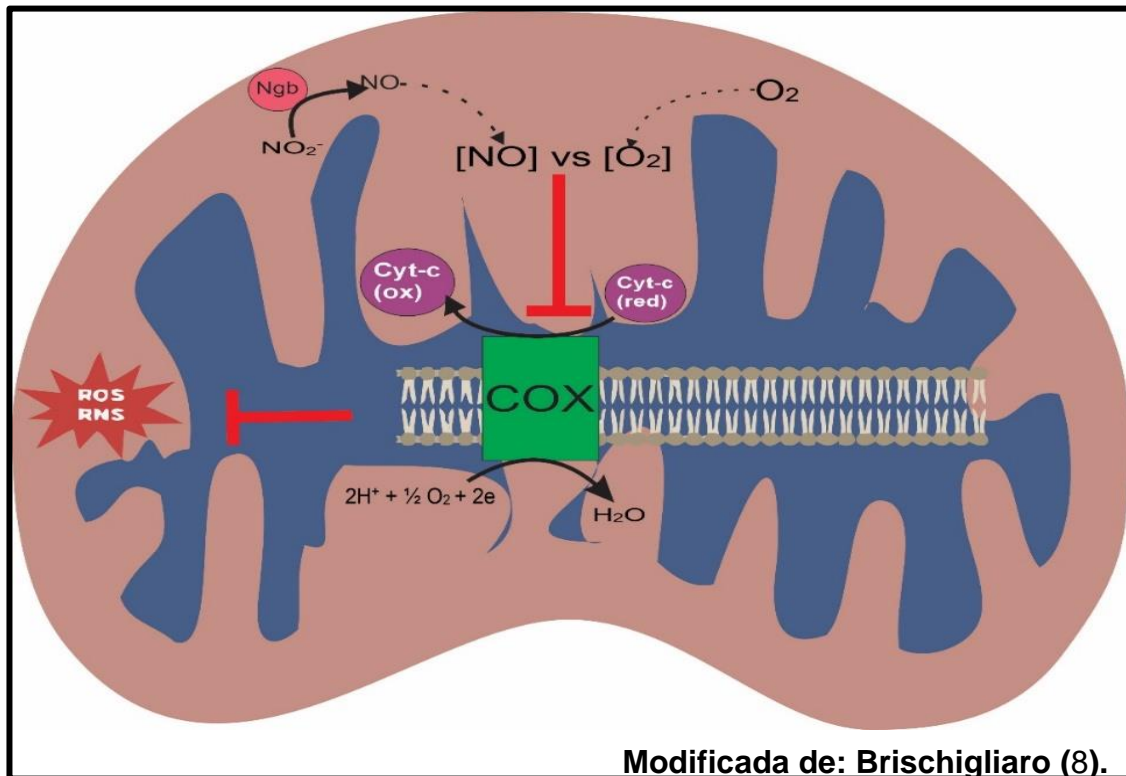
Algunos estudios inmunoquímicos revelaron la existencia de óxido nítrico (NO) sintasa unida a la membrana mitocondrial y sugieren que el NO producido en estos organelos podría ejercer un papel en el control de la función mitocondrial (123-126), ya que anteriormente se había demostrado que el NO era capaz de inhibir la respiración en partículas submitocondriales (127) y mitocondrias posteriormente (128, 129). Particularmente, se ha descubierto que la adición de NO a mitocondrias de hígado de rata deprime rápidamente la síntesis de ATP, pero esta se restablece en la presencia de  $O_2$  (130). De esta manera, se ha concluido que el grado de inhibición de la actividad de la cadena respiratoria depende de la relación molar NO/ $O_2$ , demostrando así la competencia entre estos dos ligandos por un mismo

objetivo involucrado en la cadena respiratoria (131), el cual resulta ser el complejo IV de la cadena de transporte de electrones; una enzima llamada citocromo C oxidasa (COX); la cual ha sido propuesta como una enzima que cataliza la degradación de NO a óxido nítrico ( $N_2O$ ) (132, 133) como lo sugiere la reacción (IX).



Similar a hemoglobina y mioglobina, Ngb está involucrada en la desintoxicación de NO (134). En un estudio hecho por Tiso et al. (108) mediante sistemas de expresión de lentivirus, mostró que específicamente, Ngb puede actuar como una nitrito reductasa generando NO e inhibiendo temporalmente la respiración celular (

**Figura 10)** debido a la unión de NO con COX, protegiendo a la célula del efecto dañino de especies radicalarias (108).



**Figura 10. Inhibición de COX por Ngb.** La generación de NO por parte de Ngb compite con el  $O_2$  por el sitio activo de la enzima.

## 1.2 CAMBIO CLIMÁTICO

Hablar del cambio climático es hablar de un acontecimiento “natural” en nuestro planeta que se ha convertido en un peligro para la vida debido a que su progresión ha aumentado exponencialmente por el llamado “cambio climático antropogénico”, el cual consiste en el calentamiento del planeta como consecuencia de la actividad humana y del efecto invernadero (135). El cual es causado por el excesivo atrapamiento de calor debido a la presencia de gases como el dióxido de carbono, metano, óxido nitroso y compuestos halogenados, o los fluorocarbonos en la atmósfera (136). Sin ese efecto invernadero, la temperatura de la tierra sería demasiado baja para que fuera compatible con la vida. Pero, por el contrario, un efecto invernadero excesivo podría elevar la temperatura hasta niveles también incompatibles con la vida (137).

### 1.2.1 Cambio climático y sus efectos hipóxicos, isquémicos y oxidantes en sistema nervioso

El calentamiento del planeta es capaz de deteriorar las condiciones de la naturaleza que brindan un medio ambiente y un ecosistema saludable, lo cual genera como consecuencia el desarrollo de enfermedades, dificultando su prevención y tratamiento (138).

Como se indica en el informe de 2018 de Lancet Countdown (139), la incidencia de las enfermedades relacionadas con el calor está incrementándose a escala mundial. Las personas de edad avanzada o con enfermedades crónicas están especialmente afectadas (140).

#### 1.2.1.1 Hipoxia

La hipoxia se define como el transporte y el suministro inadecuados de O<sub>2</sub> a los órganos, puede producirse cuando la presión parcial de O<sub>2</sub> ambiental es limitada o tras acontecimientos patológicos como trastornos pulmonares o deficiencias circulatorias (12). Esta patología puede causar rápidamente la muerte o daño cerebral grave ya que las células del cerebro son extremadamente sensibles a la falta de oxígeno. Algunas de estas comienzan a morir a los pocos minutos después de interrumpirse el suministro de oxígeno. Entre sus causas se encuentran la

inhalación de humo; como sucedería durante un incendio, intoxicación con monóxido de carbono, asfixia, padecimiento de enfermedades que impiden el movimiento de los músculos de la respiración, paro cardíaco y accidente cerebro vascular (141).

### 1.2.1.2 Isquemia

La isquemia cerebral o ictus se produce cuando el flujo o irrigación sanguínea se reduce, esto puede deberse a la obstrucción aguda de una de las arterias cerebrales, como la arteria cerebral media (ACM), produciendo una inmediata reducción del flujo cerebral en el área de irrigación correspondiente (isquemia focal). La reducción del flujo sanguíneo no es homogénea y puede cambiar en cuestión de minutos u horas en el sector afectado, especialmente cuando se instaura la reperfusión (restablecimiento de la circulación ) (142), la cual se asocia con estallidos oxidativos e inflamación y es la causa de más daño (143, 144).

Los procesos fisiopatológicos de la isquemia cerebral son el resultado de la secuencia de fenómenos celulares y moleculares a corto y largo plazo que confluyen en dos modalidades de muerte (145). La más común, descrita en los tratados clásicos, es la muerte necrótica, también denominada oncosis o necrofanerosis (146, 147), que resulta del fracaso energético agudo, con pérdida de la morfología celular y, finalmente, lisis con desencadenamiento de procesos inflamatorios (142, 148). Por otro lado, puede observarse la muerte apoptótica o muerte celular programada descrita anteriormente (51-53). Este deterioro y muerte neuronal implica la retracción y/o ruptura de axones con pérdida de los circuitos neuronales correspondientes que, de no ser reemplazados, conducen a un daño funcional que es difícil de recuperar (149). Dando lugar a la aparición de los denominados infartos cerebrales que se definen como áreas de necrosis que se desarrollan en sitios en los que se ha producido una isquemia grave (145).

Hay dos tipos principales de ictus: El ictus hemorrágico (15-20 %), que implica ruptura de un vaso sanguíneo que provoca una hemorragia en el cerebro e impide que el oxígeno y los nutrientes lleguen a las células cerebrales; y el ictus isquémico, el tipo más común (80-85 %), causado por un coágulo de sangre o el estrechamiento

de un vaso sanguíneo, lo que provoca la falta de oxígeno y nutrientes en una zona del cerebro. Este último tipo de ictus produce infartos, generalmente en el territorio irrigado por la arteria cerebral media, afectando principalmente a la corteza parietal y al cuerpo estriado (5).

La lesión neuronal en el ictus isquémico es consecuencia de un proceso en dos fases: (i) isquemia y (ii) reperfusión (I/R). La isquemia, que implica una disminución de oxígeno y glucosa, induce una serie de cambios metabólicos importantes denominados cascada isquémica; entre ellos se incluyen la inhibición de la cadena de transporte de electrones, el aumento de la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, RNS), daño mitocondrial, agotamiento energético, acidosis y pérdida de la homeostasis iónica, entre otros. Estos cambios conducen a la inflamación de las células, la ruptura de la membrana y, finalmente, a la muerte neuronal (150).

### 1.2.2 Olas de calor como causantes de hipoxia

Las olas de calor son definidas como periodos de más de 3 días de duración, durante los cuales la temperatura mínima es superior al percentil 99 de la media registrada entre los años 1986 y 2008 (151). Este fenómeno ocasiona el incremento del estrés relacionado con el calor y los denominados golpes de calor.

El golpe de calor es una patología en la que una persona sometida a altas temperaturas ambientales experimenta un fracaso, potencialmente letal, del sistema de termorregulación corporal, se caracteriza por temperaturas corporales  $>40$  °C y disfunción del sistema nervioso central. Se trata de una patología infradiagnosticada, de baja prevalencia, pero con elevada morbimortalidad, cuya incidencia ha aumentado en los últimos años y seguramente seguirá aumentando, debido a la frecuencia cada vez mayor de las olas de calor vinculadas al cambio climático, producto del calentamiento global (152).

Las personas afectadas por un golpe de calor requieren diagnóstico y tratamiento urgentes para evitar las lesiones, muchas veces irreversibles, que el proceso puede ocasionarles en el sistema nervioso central, los pulmones, el corazón o los riñones, y que obviamente pueden llevar a la muerte (152, 153). Cuando se produce un golpe

de calor, el cuerpo es incapaz de regular la temperatura corporal causando una situación de desajuste térmico que supone una urgencia vital en consecuencia del posible fracaso multiorgánico.

En el sistema nervioso, las alteraciones neurológicas son el punto cardinal del golpe de calor, y su grado y duración son variables. La presentación incluye: delirio, letargo, coma, convulsiones y encefalopatía. La hipertermia cerebral es multifactorial, que conlleva a: aumento de la tasa metabólica, activación generalizada y caída del flujo sanguíneo cerebral por vasoconstricción y shock que impiden la pérdida de calor cerebral (152).

Pueden manifestarse convulsiones, el coma por aumento del metabolismo y la demanda de oxígeno cuando la temperatura central supera los 40 °C, así como las llamadas paradas cardiorrespiratorias que causan hipoxia (154). A nivel neuronal, puede presentarse apoptosis y producción de ROS como consecuencia de la alta demanda de este elemento debido al aumento del metabolismo del cerebro (155-157). A temperaturas extremas y tras el fracaso de la termorregulación, existe además un daño celular directo con desnaturalización de las proteínas celulares y necrosis, que puede aparecer en los primeros minutos (157).

### 1.2.3 Gases contaminantes como causantes de ictus e hipoxia

Existe una estrecha relación entre el calentamiento global y la contaminación atmosférica, la mayoría de los gases de efecto invernadero, el smog atmosférico de las grandes ciudades, e incluso de algunas zonas rurales, y el humo doméstico constituyen una importante amenaza para la salud como causantes de enfermedades cardiovasculares, como el ictus isquémico, las coronariopatías y la insuficiencia cardíaca (137, 158).

Otro inductor de isquemia cardiovascular vinculados a cambio climático es la contaminación del aire generada por los gases de efecto invernadero directos como: CO<sub>2</sub>, metano (CH<sub>4</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y compuestos halogenados; e indirectos como: óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), monóxido de carbono (CO), compuestos orgánicos volátiles diferentes al metano y óxidos de azufre (SO<sub>x</sub>) presentes en el smog de las grandes ciudades e incluso de algunas zonas rurales;

el humo doméstico, de cigarrillos o de la industria así como el material particulado (PM) (13, 159-162).

Algunos estudios señalan a los gases de efecto invernadero como causantes de enfermedades cardiovasculares, como el ictus isquémico, las coronariopatías y la insuficiencia cardiaca (159). Otros estudios han demostrado que la exposición al aire contaminado y PM tanto a corto como a largo plazo incrementa el riesgo de sufrir infarto cerebral, incluso señalan que las políticas de salud pública y ambiental para reducir la contaminación del aire podrían reducir la carga de los accidentes cerebrovasculares (160, 161). Ha sido demostrado que por cada aumento de 5  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  de  $\text{PM}_{2.5}$ , la incidencia de ictus se incrementa 19% (13).

Aunque los mecanismos por los cuales generan isquemia no están del todo establecidos, existen algunas propuestas de posibles mecanismos biológicos para aclarar cómo los contaminantes inhalados pueden afectar negativamente al sistema cardiovascular (163-165) y eventualmente al nervioso. En primer lugar, se puede producir un desequilibrio en el sistema nervioso autónomo con activación simpaticoadrenal que puede contribuir a aumentar la presión arterial, causar vasoconstricción, hacer una placa vascular inestable o iniciar arritmias cardíacas (165). En segundo lugar, la contaminación del aire podría causar la liberación de mediadores proinflamatorios de las células pulmonares tales como lípidos modificados o fosfolípidos, citocinas, células inmunitarias activadas que se sabe que se "desbordan" en la circulación sistémica (166-168). En tercer lugar, los metales o las partículas de tamaño nanométrico pueden acceder al torrente sanguíneo y afectar el endotelio, lo que provoca una disfunción endotelial (166-168). En cuarto lugar, la contaminación del aire parece ser capaz de mediar en la activación de vías protrombóticas (169, 170).

La emisión de CO antropogénico a causa de la combustión incompleta es un potencial inductor de hipoxia en el organismo. Este contaminante se combina con la hemoglobina en los glóbulos rojos de la sangre y forma carboxihemoglobina (COHb), dado que la afinidad de la hemoglobina por CO es de unas 250 veces mayor que por  $\text{O}_2$ , y en donde la capacidad de la sangre de transportar  $\text{O}_2$  se ve

disminuida. Para el monóxido de carbono, los valores máximos de exposición recomendados son concentraciones medias en 8 horas de 10 mg/m<sup>3</sup> y valores máximos horarios de 30 mg/m<sup>3</sup> (171)

#### 1.2.4 Radiación UV causante de estrés oxidativo

La luz ultravioleta (UV) forma parte del espectro de emisiones solares que se sitúa entre el espectro de radiación electromagnética de los rayos X y la luz visible, con longitudes de onda de 100 nm a 400 nm. En función de sus longitudes de onda, la luz UV puede subdividirse en varias categorías con tres bandas, UVA, UVB y UVC (172, 173).

**UVA 320-400 nm:** Es la luz UV más comúnmente encontrada, ya que atraviesa el ozono atmosférico con pocos cambios. Inicialmente UVA provocan el oscurecimiento de los pigmentos (bronceado) seguido de quemaduras solares cuando se sobreexponen. Los rayos UVA son necesarios para la producción de vitamina D en humanos, pero una exposición excesiva puede provocar enfermedades epidérmicas, supresión del sistema inmunitario y formación de cataratas.

**UVB 290-320 nm:** La UVB es el factor clave del daño fotoquímico del ADN celular. La UVB es esencial para la producción de vitamina D en humanos; sin embargo, una exposición excesiva puede tener efectos nocivos para el cuerpo humano. Estos efectos nocivos incluyen quemaduras solares, cataratas, así como el inicio del proceso cancerígeno en la piel.

**UVC 220-290 nm:** La UVC es absorbida casi por completo por el ozono atmosférico y tiene poco efecto sobre la salud humana. Las lámparas germicidas emiten UVC para matar microbios. La exposición accidental de los seres humanos a los UVC puede causar quemaduras en la córnea y ceguera de las nieves.

Existe una parte de la estratosfera llamada capa de ozono en la que la concentración de este gas es mayor, el ozono es un gas compuesto por 3 átomos de oxígeno (O<sub>3</sub>), que se forma al interaccionar la luz ultravioleta con las moléculas

de oxígeno gaseoso (O<sub>2</sub>). Esta capa actúa como filtro de la radiación UV de ondas cortas e intermedias, que favorecen el desarrollo de cánceres cutáneos y cataratas; mientras que permite el paso de radiaciones ultravioleta de onda larga, necesarias para la vida en el planeta (137, 174). El agujero de la capa de ozono es una zona de esa capa, donde la concentración de ozono es excesivamente baja. Se atribuye al aumento de la concentración de cloro y de bromo en la estratosfera, causado por las emisiones de compuestos químicos, entre los que destacan los clorofluorocarburos (CFC), utilizados años atrás en los líquidos refrigerantes, agentes extintores, propelentes para aerosoles o construcción de plásticos. Esta situación puede provocar posteriormente un aumento de los niveles de radiación UVC que llega a la superficie terrestre (que de otro modo no podría) y, por tanto una mayor exposición humana a la radiación UV (175).

A pesar de poseer ubicación periférica, la retina o porción neural del ojo, es en realidad parte del sistema nervioso central que comprende un circuito neuronal complejo con la finalidad de convertir la actividad de los fotorreceptores en estímulos nerviosos que viajan al cerebro a través de los axones en el nervio óptico (176).

A nivel retiniano la radiación UV puede causar lesiones fotoquímicas como la degeneración macular asociada a la edad, la cual ha sido relacionada con la exposición a la luz solar. Todo el proceso de instauración de esta patología podría ser debido a un efecto de estrés fotooxidante ocasionado por las radiaciones que genera un cúmulo de radicales libres que resulta nocivo para las células retinianas ya que los segmentos externos de la retina son ricos en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son muy vulnerables al daño oxidativo (como se describe anteriormente)(177).

Pese a que el ojo cuenta con mecanismos naturales de protección tales como los párpados o el iris, que actúan cerrándose cuando la intensidad de radiación que incide les resulta excesiva; estos mecanismos tan sólo se activan con la radiación visible y no con la invisible, de ahí la necesidad de protegerlos. La córnea y el cristalino absorben la mayor parte de la radiación UVB y UVA. La porción que no es absorbida será transmitida y podrá afectar la retina, La cornea absorbe casi el 100%



Esto permite esencialmente que las moléculas de agua actúen como fuente para la generación de protones capaces de interactuar con O<sub>2</sub> para generar ROS, también se descubrió que los efectos que ejerce la luz UVB sobre la catalasa son sensibles al pH y dependientes de oxígeno, ya que el estado de oxidación intracelular influye en la actividad de la catalasa en respuesta a la luz UV para ser citotóxica o benéfica (179).

### 1.2.5 Neuroglobina ante hipoxia e isquemia

De acuerdo a Shang et al. (180), sugieren que la Ngb se comporta como una proteína compensatoria que regula el suministro de oxígeno en el proceso de desarrollo neocortical o bajo hipoxia fisiológica. Desafortunadamente, a pesar de muchos años de investigación, la distribución y expresión exactas de Ngb en el desarrollo neocortical y bajo estrés por hipoxia leve aún no están claras.

La actividad neuroprotectora de Ngb se ha descrito en numerosas publicaciones, desde neuronas cultivadas hasta modelos animales (35, 181-185), algunas de ellas realizadas sobre modelos murinos han demostrado que la expresión de Ngb está aumentada en la isquemia cerebral aguda (20, 186).

#### 1.2.5.1 Hipoxia y Ngb

La Ngb ha sido identificada en una amplia gama de vertebrados como molécula crucial en la señalización inducida por hipoxia (1). Algunos estudios han demostrado que la expresión de Ngb, como factor neuroprotector endógeno, podría desencadenarse por estrés hipóxico, contribuyendo a regular la muerte o supervivencia de células neurales (20, 187). Entre estos podemos encontrar algunos estudios *in vitro*, los cuales han demostrado que la regulación positiva de Ngb (estimular su expresión) en respuesta a hipoxia en varias líneas de células neuronales que indica la participación de Ngb en la respuesta neuronal a bajo nivel de oxígeno (20, 35, 38, 188). Mientras tanto, las investigaciones *in vivo* han demostrado que la supervivencia neuronal después de la hipoxia o isquemia

disminuye por la inhibición de Ngb, pero aumenta por la sobreexpresión de esta (20, 189, 190).

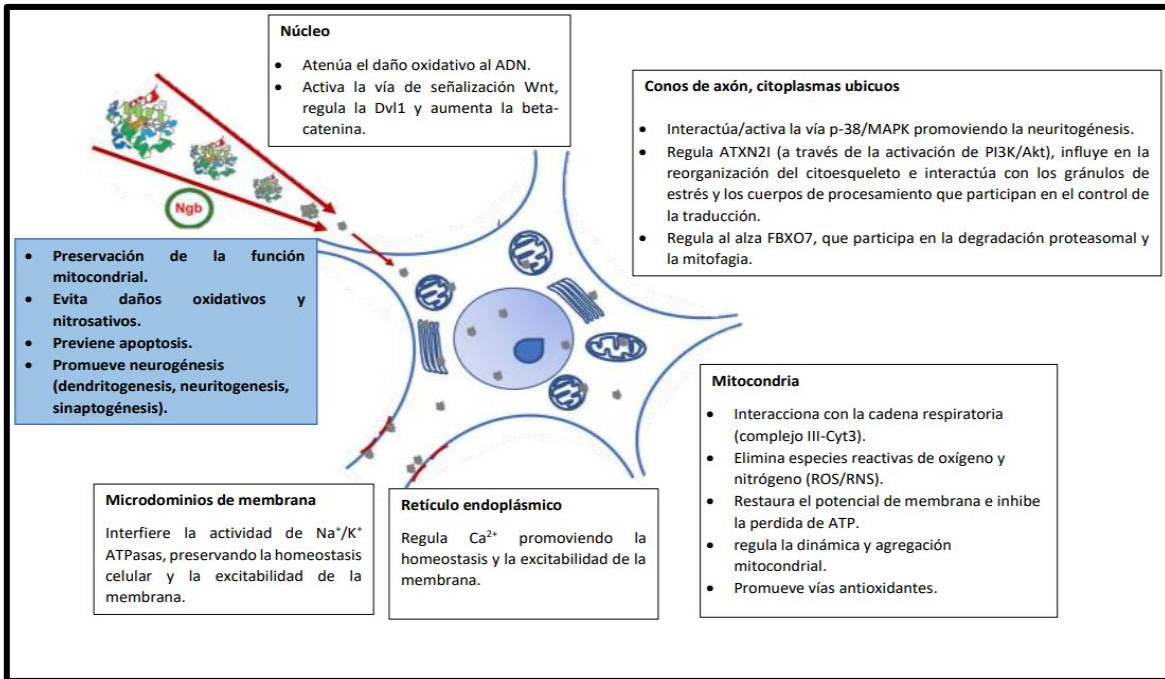
Algunos estudios realizan comparaciones de la expresión de Ngb en mamíferos terrestres y acuáticos que se someten de manera normal a condiciones de hipoxia severas sin recibir mayor daño como las ballenas y focas. La comparación proteica de Ngb entre los mamíferos terrestres y acuáticos reveló diferencias menores en su secuencia, sólo dos o tres aminoácidos, lo que no confiere diferencias funcionales entre ambos grupos y refleja un alto nivel de conservación. Sin embargo, los niveles de expresión de ARNm de Ngb fueron 4-15 veces más altos en el cerebro de focas y ballenas que en los de mamíferos terrestres, lo que sugiere que niveles más altos de Ngb en mamíferos acuáticos puede ser un mecanismo neuroprotector contra la hipoxia cerebral y la producción de ROS (191).

#### 1.2.5.2 Isquemia cerebral y Ngb

En el ictus, Khan et al. (189), mostraron una reducción del 30 % en el tamaño del infarto cerebral tras la oclusión de la arteria media cerebral (o middle cerebral artery occlusion por sus siglas en inglés, MCAO) utilizando ratones transgénicos con sobreexpresión de Ngb (Ngb-Tg). otros trabajos demuestran que la administración intracerebral de un vector de virus adenoasociado que expresa Ngb redujo el tamaño del infarto y mejoró los resultados funcionales en un modelo de MCAO (192).

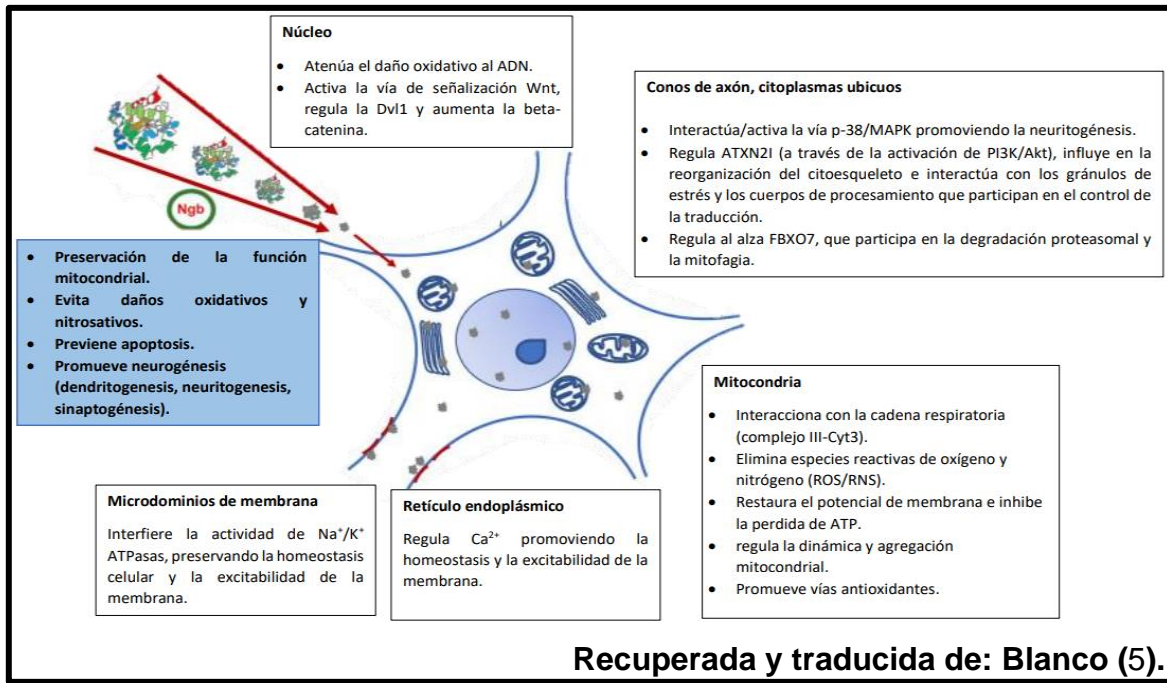
#### 1.2.5.3 Mecanismo protector de Ngb ante hipoxia/isquemia

A pesar de que la acción neuroprotectora del Ngb tras el daño isquémico está bien documentada, los mecanismos que subyacen a este papel aún no se conocen del todo ( algunos se mencionan en la



**Figura 11) (193).** Se ha informado de que la Ngf puede interactuar directamente con componentes de la cadena transportadora de electrones, principalmente con el complejo III, conduciendo a una mejor funcionalidad mitocondrial (194). La acción neuroprotectora de la Ngf contra la isquemia cerebral focal en ratones Ngf-Tg puede deberse no sólo a una disminución del estrés oxidativo (195), sino también a la preservación de la síntesis de ATP (39, 196), o incluso a la atenuación del daño oxidativo al ADN (197, 198). Otros mecanismos moleculares en los que puede basarse la implicación de Ngf en las vías de muerte celular desencadenadas por el ictus incluyen la reducción de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP); evitando así la liberación de Cyt-c tras la I/R (78), la modulación de canales en el retículo endoplásmico; evitando la elevación del calcio citoplasmático para inhibir la muerte celular que se produce tras la I/R (199), la preservación la homeostasis celular y la excitabilidad de la membrana plasmática; al interferir con la actividad de las Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasas tras el reclutamiento de Ngf en microdominios de la membrana (200). Otros estudios sugieren que, a nivel nuclear, la sobreexpresión de Ngf promueve la neurogénesis en cerebros de ratón tras isquemia; este efecto fue estudiado en células progenitoras neuronales cultivadas, y validado posteriormente en modelos de ictus en ratones. En estos estudios, se ha

sugerido que el papel de la Ngb podría estar mediado a través de la regulación al alza de Dvl1, previa activación de la vía de señalización Wnt, que conduce a una mayor localización nuclear de beta-catenina (201).



**Figura 11 Mecanismos moleculares neuroprotectores de Ngb.** La proteína Ngb potencia la neuroregeneración al interferir en diferentes procesos y vías moleculares implicados en la neurogénesis y la restitución de la red neuronal.

## CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los científicos llevan años advirtiendo que los problemas medioambientales causados por la acción del ser humano, ponen en peligro tanto la salud del planeta como la nuestra, a tal grado que actualmente el cambio climático es uno de los principales problemas que enfrenta la sociedad del siglo XXI. Las consecuencias del cambio climático no se limitan a la degradación de las condiciones ambientales, sino que se extienden al terreno de la salud al ser causantes de enfermedades, plagas y hambrunas.

Los daños neurológicos provocados por el cambio climático están causados principalmente por las ondas de calor y la mayor exposición a rayos UV producto del daño a la capa de ozono y la acumulación de gases de efecto invernadero en la

misma. Lo anterior ha generado la presencia de condiciones hipóxicas, isquémicas o ictus y el incremento de estrés oxidativo en la población, dañando gravemente el tejido neural. Hallazgos indican que neuroglobina, proteína con acción neuroprotectora, tiene importantes efectos antioxidantes y antiapoptóticos; aunque aún se requiere tener más estudios que indaguen sobre la relación directa de los daños originados por el cambio climático en relación con la importancia de Ngb.

Considerando que aun la literatura científica relacionada a explicar cuáles son las afectaciones neurológicas causadas por el cambio climático es limitada; el análisis y referencia de lo que se plantea en este trabajo puede dar valor para concientizar y generar algunas acciones que mitiguen el cambio climático, pues sus consecuencias pueden seguir afectando y alterando el funcionamiento neurológico hasta causar daños irreversibles.

### CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

A la fecha el cambio climático es un fenómeno que está causando estragos significativos tanto al medio ambiente como a la salud del hombre; de hecho, las altas temperaturas, así como la contaminación del aire, entre otros tienen efectos significativos sobre diferentes patologías que se expresan de diferente forma en la salud humana. La calidad de vida del humano se ha visto afectada singularmente por lo anteriormente planteado, ya que esta sufre algunos efectos neurodegenerativos. Por otra parte, Ngb es una proteína presente en las zonas más adaptadas al estrés fisiológico del sistema nervioso central, se ha documentado que esta proteína presenta funciones antiapoptóticas y antioxidantes orientados a mitigar los efectos producidos por la hipoxia o las condiciones isquémicas en el organismo. Por lo que es importante analizar cuál es la relación entre los efectos del cambio climático con la expresión de neuroglobina, la cual podría verse incrementada conforme exista un daño mayor por efecto del cambio climático.

## CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

### GENERAL

- Profundizar la relación existente del cambio climático con la expresión de neuroglobina.

### PARTICULARES

- Describir los efectos neurodegenerativos potenciados por el cambio climático que influyen en la expresión de neuroglobina.
- Describir los mecanismos de neuroprotección empleados por neuroglobina ante los efectos neurodegenerativos del cambio climático.

## CAPÍTULO 5. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE INVESTIGACIÓN

Se recopiló información mediante una revisión sistemática en los buscadores de Elsevier, Springer, PubMed, Google Académico, SciELO y Redalyc. Los resultados de búsqueda se filtraron según el tipo de artículo, por medio de la lectura del abstract para seleccionar los más adecuados o por las citas que contuvieran. Los parámetros de búsqueda se individualizaron en cada apartado, buscando bibliografía relacionada con cada uno de los títulos. Finalmente se establecieron las conclusiones del trabajo con base en toda la investigación previa.

La bibliografía principal relacionada al tema central del escrito se priorizó con respecto a la fecha de publicación, con la intención de mostrar los adelantos más recientes.

## CAPÍTULO 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El cambio climático se considera un fenómeno natural que ha favorecido el desarrollo de la vida desde los tiempos más antiguos hasta el día de hoy; sin embargo, la actividad humana, principalmente desde la revolución industrial ha favorecido un incremento muy marcado en la progresión del cambio climático a tal punto que hoy se considera un problema grave y una amenaza para las futuras

generaciones. Las consecuencias más conocidas se enfocan en efectos que podemos notar como la alteración de los patrones climáticos, el aumento en la frecuencia de los desastres naturales, la pérdida de biodiversidad e incluso la pérdida de cosechas en las zonas rurales. Todas ellas en conjunto representan una adversidad para las naciones en términos ambientales, políticos, económicos sociales y de salud. En este último campo existe evidencia científica de las consecuencias negativas provocadas por el cambio climático sobre la salud de las personas; la relación entre la progresión del cambio climático con la neurodegeneración es un tema que ha sido poco estudiado. Este impacto en la salud se ha acelerado en los últimos años y podría deberse en gran parte al aumento en la incidencia y la agravación de diversas patologías, en particular de aquellas relacionadas con la generación de estrés oxidativo y nitrosativo, isquemia, reducción en los niveles  $O_2$  disponibles para el organismo y de muerte celular como consecuencia final. La evidencia sugiere que los inductores de estas condiciones pueden ser: las olas de calor, la exposición a radiación UV, exposición a gases contaminantes o GEI y  $PM_{2.5}$ .

Diversas investigaciones respaldan el papel neuroprotector de la Ngb como se describió anteriormente, sin embargo, la efectividad de la protección que brinda Ngb presenta una debilidad marcada por el paso del tiempo, en otras palabras, a medida que los organismos envejecen las capacidades de autorregulación también se ven disminuidas por el deterioro morfofuncional de las células a causa del envejecimiento fisiológico (202). Es un hecho que la esperanza de vida de las personas ha aumentado exponencialmente desde el siglo pasado, aunque solo es posible especular sobre las causas de estos episodios de aplazamiento de la mortalidad, se cree que podrían estar relacionadas con una ola de mejoras en la salud pública y la tecnología médica (203). Sin embargo existen estudios que sitúan el límite de la longevidad con un máximo de 150 años, en el cual el cuerpo humano perdería totalmente la capacidad de recuperarse de enfermedades y lesiones, lo que provocaría eventualmente la muerte (204). Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Sun et al. (205), donde se comparó la expresión de Ngb en cerebros de ratones jóvenes y envejecidos ( de 3, 12 y 24 meses de vida) tras el

sacrificio posterior a la hipoxia por inhalación de CO<sub>2</sub> mediante técnicas de inmunofluorescencia, PCR y western blot. Los resultados de este estudio muestran una disminución significativa en la expresión de Ngb por los ratones envejecidos en comparación con los jóvenes. Estos hallazgos sustentan que la efectividad de la protección que brinda la Ngb se pierde con el pasar de los años y de esta manera se puede predisponer a las neuronas a la neurodegeneración.

Ya que la Ngb se expresa en subtipos neuronales que presentan vulnerabilidad a enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y las ataxias espinocerebelosas, en donde la expresión de Ngb puede representar un mecanismo de protección intrínseco que no funciona eficazmente en los individuos afectados por estas patologías, las cuales se producen con mayor frecuencia a medida que avanza la edad (205).

El cambio climático no solo favorece la neurodegeneración mediante el aumento en la incidencia de patologías que inducen la expresión de Ngb como mecanismo de protección, sino que también afecta directamente a las células que pueden producir esta proteína. A pesar de la alta estabilidad estructural que presenta Ngb a temperaturas superiores a 100 °C y valores de pH bajos de hasta 2,0 antes de la desnaturalización (27, 206), la actividad neuroprotectora de esta proteína se ve mermada por la muerte neuronal en eventos como los golpes de calor una vez que la temperatura supera los 40 °C (152).

La biotecnología es de gran importancia en el estudio de las estructuras y funciones fisiológicas de moléculas neuroprotectoras tales como Ngb, la cual presenta un alto potencial para combatir los efectos del cambio climático, además de ser una molécula de interés en el campo médico para el desarrollo de tratamientos y métodos de diagnóstico para diversas patologías como podrían ser enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares e incluso el cáncer.

Por otro lado, las aportaciones de la biotecnología no se limitan al terreno de la salud, sino que se extienden también al sector ambiental. Ante la problemática que representa el cambio climático para la sociedad del siglo XXI cabe mencionar que

la biotecnología juega un papel significativo en el combate a su progresión. En los últimos años se ha generado un gran desarrollo de aplicaciones científico-tecnológicas de agentes biológicos (microorganismos, enzimas, células de animales o de plantas, principalmente) con el objetivo de gestionar, preservar y mantener los recursos naturales de la tierra (207). Estos intereses ambientales de las ciencias biológicas conforman el concepto biotecnología ambiental, la cual aporta nuevas herramientas metodológicas con el fin de poder responder a este reto climático, además de promover un desarrollo socioeconómico sostenible, respetuoso con el medio ambiente. Entre estas herramientas podemos encontrar algunas enfocadas al control de las emisiones de CO<sub>2</sub> al contribuir al desarrollo de procesos que permitan disponer de fuentes energéticas renovables, principalmente biomasa, para producir energía a partir de recursos renovables sin una emisión neta de dióxido de carbono. Los desarrollos de métodos más destacables se están haciendo con el estudio de procesos alternativos de producción de electricidad o utilización del metabolismo microbiano para producir gas natural (metano), etanol o hidrógeno a través de la oxidación de compuestos orgánicos. Otros enfoques de la biotecnología pretenden hacer uso de la comprensión de la estructura y de las funciones microbianas para proporcionar herramientas que ayuden en la descontaminación de suelos y sedimentos, la eliminación de contaminantes en el aire y la degradación de compuestos recalcitrantes procedentes de diferentes actividades humanas.

## CAPÍTULO 7. PERSPECTIVAS PARA EL FUTURO

En un contexto en el que las consecuencias del cambio climático empeoran año con año y los mecanismos endógenos de protección como la expresión de Ngb es efectiva durante un periodo de tiempo limitado, se puede deducir que en un futuro no muy lejano los daños neurodegenerativos, principalmente entre la población envejecida podrían verse incrementados y representar un problema de salud aún más grave, pero esta hipótesis requiere de un estudio más profundo.

## CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

La expresión de neuroglobina es un mecanismo de neuroprotección efectivo para mitigar la neurodegeneración.

Es necesario tener en cuenta los riesgos neurológicos causados por hipoxia, isquemia y estrés oxidativo derivados del cambio climático ya que su consideración es de valor para sustentar la necesidad de mitigar la progresión del cambio climático antes de que sus consecuencias a nivel neurológico superen nuestras posibilidades de asegurar una buena calidad de vida para las futuras generaciones y evitar daños irreversibles.

## CAPÍTULO 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T. A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*. 2000;407(6803):520-3.
2. Guidolin D, Tortorella C, Marcoli M, Maura G, Agnati LF. Neuroglobin, a factor playing for nerve cell survival. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):1817.
3. Fiocchetti M, Fernandez VS, Montalesi E, Marino M. Neuroglobin: a novel player in the oxidative stress response of cancer cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019.
4. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*. 2020;94(3):651-715.
5. Blanco S, Martínez-Lara E, Siles E, Peinado MÁ. New Strategies for Stroke Therapy: Nanoencapsulated Neuroglobin. *Pharmaceutics*. 2022;14(8):1737.
6. Solar Fernandez V, Cipolletti M, Ascenzi P, Marino M, Fiocchetti M. Neuroglobin as key mediator in the 17 $\beta$ -estradiol-induced antioxidant cell response to oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2020;32(4):217-27.
7. Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, et al. Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *Journal of inorganic biochemistry*. 2005;99(1):110-9.
8. Brischiari M, Zeviani M. Cytochrome c oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*. 2021;1862(1):148335.
9. Watanabe S, Takahashi N, Uchida H, Wakasugi K. Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection. *J Biol Chem*. 2012;287(36):30128-38.
10. Brittain T, Skommer J, Henty K, Birch N, Raychaudhuri S. A role for human neuroglobin in apoptosis. *IUBMB Life*. 2010;62(12):878-85.
11. Herold S, Fago A, Weber RE, Dewilde S, Moens L. Reactivity studies of the Fe (III) and Fe (II) NO forms of human neuroglobin

reveal a potential role against oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(22):22841-7.

12. Ascenzi P, di Masi A, Leboffe L, Fiocchetti M, Nuzzo MT, Brunori M, et al. Neuroglobin: From structure to function in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2016;52:1-48.

13. Stafoggia M, Cesaroni G, Peters A, Andersen ZJ, Badaloni C, Beelen R, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and incidence of cerebrovascular events: results from 11 European cohorts within the ESCAPE project. *Environmental health perspectives*. 2014;122(9):919-25.

14. Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed Cell-Death by Ferroptosis: Antioxidants as Mitigators. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19).

15. Forrellat Barrios M, Hernández Ramírez P. Neuroglobina: Nuevo miembro de la familia de las globinas. *Revista cubana de hematología, inmunología y hemoterapia*. 2011;27(3):291-6.

16. Peñuela OA. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*. 2005;36(3):215-25.

17. Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson JC, et al. Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(9):8063-9.

18. Pesce A, De Sanctis D, Nardini M, Dewilde S, Moens L, Hankeln T, et al. Reversible hexa-to penta-coordination of the heme Fe atom modulates ligand binding properties of neuroglobin and cytoglobin. *IUBMB life*. 2004;56(11-12):657-64.

19. Burmester T, Hankeln T. What is the function of neuroglobin? *Journal of Experimental Biology*. 2009;212(10):1423-8.

20. Sun Y, Jin K, Mao X, Zhu Y, Greenberg D. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Google Patents*; 2005.

21. Martínez Sánchez E. Presencia de neuroglobina en sujetos deficientes de hierro. 2020.

22. Schmidt M, Giessler A, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T. How does the eye breathe?: evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(3):1932-5.
23. Reuss S, Saaler-Reinhardt S, Weich B, Wystub S, Reuss M, Burmester T, et al. Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience*. 2002;115(3):645-56.
24. Hundahl CA, Allen GC, Nyengaard JR, Dewilde S, Carter BD, Kelsen J, et al. Neuroglobin in the rat brain: localization. *Neuroendocrinology*. 2008;88(3):173-82.
25. Hundahl CA, Kelsen J, Dewilde S, Hay-Schmidt A. Neuroglobin in the rat brain (II): co-localisation with neurotransmitters. *Neuroendocrinology*. 2008;88(3):183-98.
26. Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Burmester T, Maas U, Saaler-Reinhardt S, et al. Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neuroscience letters*. 2003;346(1-2):114-6.
27. Baez E, Echeverria V, Cabezas R, Ávila-Rodríguez M, Garcia-Segura LM, Barreto GE. Protection by Neuroglobin Expression in Brain Pathologies. *Front Neurol*. 2016;7:146.
28. Hundahl CA, Allen GC, Hannibal J, Kjaer K, Rehfeld JF, Dewilde S, et al. Anatomical characterization of cytoglobin and neuroglobin mRNA and protein expression in the mouse brain. *Brain research*. 2010;1331:58-73.
29. De Marinis E, Fiocchetti M, Acconcia F, Ascenzi P, Marino M. Neuroglobin upregulation induced by 17 $\beta$ -estradiol sequesters cytochrome c in the mitochondria preventing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *Cell death & disease*. 2013;4(2):e508-e.
30. Fiocchetti M, Camilli G, Acconcia F, Leone S, Ascenzi P, Marino M. ER $\beta$ -dependent neuroglobin up-regulation impairs 17 $\beta$ -estradiol-induced apoptosis in DLD-1 colon cancer cells upon oxidative stress injury. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;149:128-37.

31. Fiocchetti M, Nuzzo M, Totta P, Acconcia F, Ascenzi P, Marino M. Neuroglobin, a pro-survival player in estrogen receptor  $\alpha$ -positive cancer cells. *Cell death & disease*. 2014;5(10):e1449-e.
32. Burmester T, Hankeln T. Neuroglobin: a respiratory protein of the nervous system. *Physiology*. 2004;19(3):110-3.
33. Awenius C, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobins from the zebrafish *Danio rerio* and the pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;287(2):418-21.
34. Fago A, Hundahl C, Dewilde S, Gilany K, Moens L, Weber RE. Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin: molecular mechanisms and physiological significance. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(43):44417-26.
35. Schmidt-Kastner R, Haberkamp M, Schmitz C, Hankeln T, Burmester T. Neuroglobin mRNA expression after transient global brain ischemia and prolonged hypoxia in cell culture. *Brain research*. 2006;1103(1):173-80.
36. Khan AA, Mao XO, Banwait S, DerMardirossian CM, Bokoch GM, Jin K, et al. Regulation of hypoxic neuronal death signaling by neuroglobin. *The FASEB journal*. 2008;22(6):1737-47.
37. Fordel E, Thijs L, Moens L, Dewilde S. Neuroglobin and cytoglobin expression in mice: evidence for a correlation with reactive oxygen species scavenging. *The FEBS Journal*. 2007;274(5):1312-7.
38. Shao G, Gong K-R, Li J, Xu X-J, Gao C-Y, Zeng X-Z, et al. Antihypoxic effects of neuroglobin in hypoxia-preconditioned mice and SH-SY5Y cells. *Neurosignals*. 2009;17(3):196-202.
39. Liu J, Yu Z, Guo S, Lee SR, Xing C, Zhang C, et al. Effects of neuroglobin overexpression on mitochondrial function and oxidative stress following hypoxia/reoxygenation in cultured neurons. *Journal of neuroscience research*. 2009;87(1):164-70.

40. Ye S-q, Zhou X-y, Lai X-j, Zheng L, Chen X-q. Silencing neuroglobin enhances neuronal vulnerability to oxidative injury by down-regulating 14-3-3 $\gamma$ . *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009;30(7):913-8.
41. Yu Z, Zhang Y, Liu N, Yuan J, Lin L, Zhuge Q, et al. Roles of neuroglobin binding to mitochondrial complex III subunit cytochrome c1 in oxygen-glucose deprivation-induced neurotoxicity in primary neurons. *Molecular Neurobiology*. 2016;53(5):3249-57.
42. Li RC, Guo SZ, Lee SK, Gozal D. Neuroglobin protects neurons against oxidative stress in global ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2010;30(11):1874-82.
43. Gorgun MF, Zhuo M, Dineley KT, Englander EW. Elevated neuroglobin lessens neuroinflammation and alleviates neurobehavioral deficits induced by acute inhalation of combustion smoke in the mouse. *Neurochemical research*. 2019;44(9):2170-81.
44. Cai B, Lin Y, Xue X-H, Fang L, Wang N, Wu Z-Y. TAT-mediated delivery of neuroglobin protects against focal cerebral ischemia in mice. *Experimental neurology*. 2011;227(1):224-31.
45. Raychaudhuri S, Skommer J, Henty K, Birch N, Brittain T. Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death. *Apoptosis*. 2010;15(4):401-11.
46. Fago A, Mathews AJ, Brittain T. A role for neuroglobin: resetting the trigger level for apoptosis in neuronal and retinal cells. *IUBMB life*. 2008;60(6):398-401.
47. Kleinknecht A, Popova B, Lázaro DF, Pinho R, Valerius O, Outeiro TF, et al. C-terminal tyrosine residue modifications modulate the protective phosphorylation of serine 129 of  $\alpha$ -synuclein in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS genetics*. 2016;12(6):e1006098.
48. Van Acker ZP, Declerck K, Luyckx E, Berghe WV, Dewilde S. Non-methylation-linked mechanism of REST-induced neuroglobin expression impacts mitochondrial phenotypes in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience*. 2019;412:233-47.

49. Lechauve C, Augustin S, Cwerman-Thibault H, Bouaita A, Forster V, Célier C, et al. Neuroglobin involvement in respiratory chain function and retinal ganglion cell integrity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2012;1823(12):2261-73.
50. Fiocchetti M, Cracco P, Montalesi E, Fernandez VS, Stuart JA, Marino M. Neuroglobin and mitochondria: the impact on neurodegenerative diseases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2021;701:108823.
51. Banasiak KJ, Xia Y, Haddad GG. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in neurobiology*. 2000;62(3):215-49.
52. Rami A, Agarwal R, Botez G, Winckler J.  $\mu$ -Calpain activation, DNA fragmentation, and synergistic effects of caspase and calpain inhibitors in protecting hippocampal neurons from ischemic damage. *Brain research*. 2000;866(1-2):299-312.
53. Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Progress in neurobiology*. 2000;62(3):273-95.
54. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516.
55. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000;407(6805):784-8.
56. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology*. 2003;171(9):4672-9.
57. Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharmacotherapy library*. 2000;31:281-6.
58. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*. 2020;81:1133-43.
59. Saelens X, Festjens N, Walle LV, Gurp Mv, Loo Gv, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*. 2004;23(16):2861-74.

60. Xu W, Jing L, Wang Q, Lin C-C, Chen X, Diao J, et al. Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget*. 2015;6(30):30017.
61. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Apoptosis. In: Omega E, editor. *Biología molecular de la célula* 2010. p. 1115-29.
62. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death *Physiol Rev*. 2007;87:99-163.
63. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*. 2014;2014.
64. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999;341 ( Pt 2)(Pt 2):233-49.
65. Lechauve C, Rezaei H, Celier C, Kiger L, Corral-Debrinski M, Noinville S, et al. Neuroglobin and prion cellular localization: investigation of a potential interaction. *J Mol Biol*. 2009;388(5):968-77.
66. Skommer J, Helbo S, Henty K, Brittain T. Ligand binding, reactivity and biological activity of a distal pocket mutant of neuroglobin. *Int J Biol Macromol*. 2012;51(3):284-90.
67. Brittain T, Skommer J, Raychaudhuri S, Birch N. An antiapoptotic neuroprotective role for neuroglobin. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(6):2306-21.
68. Fago A, Mathews AJ, Moens L, Dewilde S, Brittain T. The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b5 and cytochrome c. *FEBS letters*. 2006;580(20):4884-8.
69. De Marinis E, Acaz-Fonseca E, Arevalo M, Ascenzi P, Fiocchetti M, Marino M, et al. 17 $\beta$ -Oestradiol anti-inflammatory effects in primary astrocytes require oestrogen receptor  $\beta$ -mediated neuroglobin up-regulation. *Journal of neuroendocrinology*. 2013;25(3):260-70.

70. Caroppi P, Sinibaldi F, Fiorucci L, Santucci R. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(31):4058-65.
71. Wang Y-J, Peng Q-Y, Deng S-Y, Chen C-X, Wu L, Huang L, et al. Hemin protects against oxygen–glucose deprivation-induced apoptosis activation via neuroglobin in SH-SY5Y cells. *Neurochemical Research*. 2017;42:2208-17.
72. Zhang B, Liu Y, Li Y, Zhe X, Zhang S, Zhang L. Neuroglobin promotes the proliferation and suppresses the apoptosis of glioma cells by activating the PI3K/AKT pathway. *Molecular Medicine Reports*. 2018;17(2):2757-63.
73. Hu J, Cao X, Pang D, Luo Q, Zou Y, Feng B, et al. Tumor grade related expression of neuroglobin is negatively regulated by PPAR $\gamma$  and confers antioxidant activity in glioma progression. *Redox Biology*. 2017;12:682-9.
74. Bønding SH, Henty K, Dingley AJ, Brittain T. The binding of cytochrome c to neuroglobin: a docking and surface plasmon resonance study. *Int J Biol Macromol*. 2008;43(3):295-9.
75. Kluck RM, Ellerby LM, Ellerby HM, Naiem S, Yaffe MP, Margoliash E, et al. Determinants of cytochrome c pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation. *J Biol Chem*. 2000;275(21):16127-33.
76. Bayrhuber M, Meins T, Habeck M, Becker S, Giller K, Villinger S, et al. Structure of the human voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(40):15370-5.
77. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):621-32.
78. Yu Z, Liu N, Li Y, Xu J, Wang X. Neuroglobin overexpression inhibits oxygen–glucose deprivation-induced mitochondrial permeability transition pore opening in primary cultured mouse cortical neurons. *Neurobiology of Disease*. 2013;56:95-103.

79. Guan S, Zhao L, Peng R. Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes: From Structure to Function. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22).
80. Gülcin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology.* 2012;86:345-91.
81. Sousa FL, Thiergart T, Landan G, Nelson-Sathi S, Pereira IA, Allen JF, et al. Early bioenergetic evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2013;368(1622):20130088.
82. Cheignon Cm, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox biology.* 2018;14:450-64.
83. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine.* 1989;82(12):747-52.
84. Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica.* 2019;36(1):91-100.
85. Venereo Gutiérrez JR. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar.* 2002;31(2):126-33.
86. Naqui A, Chance B, Cadenas E. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem.* 1986;55:137-66.
87. Romero A, Bueno G. Radicales libres del oxígeno y antioxidantes en medicina. *Rev Clin Española.* 1998;184(7):345-6.
88. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(7):1126-67.
89. Schmidt HH, Stocker R, Vollbracht C, Paulsen G, Riley D, Daiber A, et al. Antioxidants in Translational Medicine. *Antioxid Redox Signal.* 2015;23(14):1130-43.
90. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30(1):11-26.

91. Mayor Oxilia R. Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante. *Revista del instituto de medicina tropical*. 2010;5(2):23-9.
92. Escarza JMO, López MEM. Estrés oxidativo¿ un asesino silencioso? *Educación química*. 2020;31(1):2-11.
93. Mohammed MT, Kadhim SM, Jassimand A, Abbas S. Free radicals and human health. *International journal of innovation sciences and research*. 2015;4(6):218-23.
94. Jerlich A, Pitt AR, Schaur RJ, Spickett CM. Pathways of phospholipid oxidation by HOCl in human LDL detected by LC-MS. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;28(5):673-82.
95. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*. 1989;58(1):79-110.
96. Reilly P, Bulkeley G. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Journal of British Surgery*. 1990;77(12):1323-4.
97. Collado E, Alvira D. Estrés oxidativo y degradación de proteínas. *Medicina clínica*. 1994;103(5):189-96.
98. Fraga CG, Shigenaga MK, Park J-W, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(12):4533-7.
99. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*. 1996;313(Pt 1):17.
100. Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat J-L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Volume 131: Special Issue on Membrane-Mediated Cellular Responses: The Roles of Reactive Oxygens, NO, CO, II*. 2005:1-87.
101. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med*. 1991;91(3c):14s-22s.

102. Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:15-25.
103. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford university press, USA; 2015.
104. Canada AT, Calabrese EJ. Superoxide dismutase: its role in xenobiotic detoxification. *Pharmacol Ther.* 1989;44(2):285-95.
105. Alfonso-Prieto M, Biarnés X, Vidossich P, Rovira C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc.* 2009;131(33):11751-61.
106. Sharma G, Shin EJ, Sharma N, Nah SY, Mai HN, Nguyen BT, et al. Glutathione peroxidase-1 and neuromodulation: Novel potentials of an old enzyme. *Food Chem Toxicol.* 2021;148:111945.
107. Amri F, Ghouili I, Amri M, Carrier A, Masmoudi-Kouki O. Neuroglobin protects astroglial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptotic cell death. *Journal of neurochemistry.* 2017;140(1):151-69.
108. Tiso M, Tejero J, Basu S, Azarov I, Wang X, Simplaceanu V, et al. Human neuroglobin functions as a redox-regulated nitrite reductase. *Journal of Biological Chemistry.* 2011;286(20):18277-89.
109. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in biochemical sciences.* 2014;39(4):199-218.
110. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox biology.* 2013;1(1):45-9.
111. Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, Visvanathan K, Groopman JD, Chen J-G, et al. Keap1–nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. *Natural products in cancer prevention and therapy.* 2013:163-77.

112. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *Journal of biological chemistry*. 2009;284(20):13291-5.
113. Fiocchetti M, Cipolletti M, Ascenzi P, Marino M. Dissecting the 17 $\beta$ -estradiol pathways necessary for neuroglobin anti-apoptotic activity in breast cancer. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(7):5087-103.
114. Auger KR, Serunian LA, Soltoff SP, Libby P, Cantley LC. PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell*. 1989;57(1):167-75.
115. Ruderman NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990;87(4):1411-5.
116. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 2006;7(8):606-19.
117. Fayard E, Tintignac LA, Baudry A, Hemmings BA. Protein kinase B/Akt at a glance. *Journal of cell science*. 2005;118(24):5675-8.
118. Liu S-L, Wang Z-G, Hu Y, Xin Y, Singaram I, Gorai S, et al. Quantitative lipid imaging reveals a new signaling function of phosphatidylinositol-3, 4-bisphosphate: isoform-and site-specific activation of Akt. *Molecular cell*. 2018;71(6):1092-104. e5.
119. Zhang B, Ji X, Zhang S, Ren H, Wang M, Guo C, et al. Hemin-mediated neuroglobin induction exerts neuroprotection following ischemic brain injury through PI3K/Akt signaling. *Molecular Medicine Reports*. 2013;8(2):681-5.
120. Li Y, Dai Y-b, Sun J-y, Xiang Y, Yang J, Dai S-y, et al. Neuroglobin attenuates beta amyloid-induced apoptosis through inhibiting caspases activity by activating PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2016;58:28-38.
121. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med*. 2015;87:84-97.

122. Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002;419(6904):316-21.
123. Kobzik L, Stringer B, Balligand JL, Reid MB, Stamler JS. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;211(2):375-81.
124. Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;213(3):896-900.
125. Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;218(1):40-4.
126. Frandsen U, Lopez-Figueroa M, Hellsten Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;227(1):88-93.
127. Carr GJ, Ferguson SJ. Nitric oxide formed by nitrite reductase of *Paracoccus denitrificans* is sufficiently stable to inhibit cytochrome oxidase activity and is reduced by its reductase under aerobic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1990;1017(1):57-62.
128. Cleeter M, Cooper J, Darley-Usmar V, Moncada S, and Schapira A. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide: implications for neurodegenerative diseases. *FEBS letters*. 1994;345(1):50-4.
129. Koivisto A, Matthias A, Bronnikov G, Nedergaard J. Kinetics of the inhibition of mitochondrial respiration by NO. *FEBS letters*. 1997;417(1):75-80.

130. Takehara Y, Kanno T, Yoshioka T, Inoue M, Utsumi K. Oxygen-dependent regulation of mitochondrial energy metabolism by nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1995;323(1):27-32.
131. Brunori M, Giuffrè A, Sarti P, Stubauer G, Wilson MT. Nitric oxide and cellular respiration. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 1999;56(7-8):549-57.
132. Zhao X-J, Sampath V, Caughey WS. Cytochrome c oxidase catalysis of the reduction of nitric oxide to nitrous oxide. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;212(3):1054-60.
133. Borutaité V, Brown GC. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochemical Journal*. 1996;315(1):295-9.
134. Brunori M, Giuffrè A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B. Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(24):8483-8.
135. Malhi Y, Franklin J, Seddon N, Solan M, Turner MG, Field CB, et al. Climate change and ecosystems: threats, opportunities and solutions. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2020;375(1794):20190104.
136. Ebi KL, Ogden NH, Semenza JC, Woodward A. Detecting and attributing health burdens to climate change. *Environmental health perspectives*. 2017;125(8):085004.
137. Villanueva BR, Salvador MB, Huelgas RG. Cambio climático y salud. *Revista Clínica Española*. 2019;219(5):260-5.
138. Kim K-H, Kabir E, Ara Jahan S. A review of the consequences of global climate change on human health. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 2014;32(3):299-318.
139. Watts N, Amann M, Arnell N, Ayeb-Karlsson S, Belesova K, Berry H, et al. The 2018 report of the Lancet Countdown on health and climate change: shaping the health of nations for centuries to come. *The Lancet*. 2018;392(10163):2479-514.

140. Leyva EWA, Beaman A, Davidson PM. Health impact of climate change in older people: an integrative review and implications for nursing. *Journal of Nursing Scholarship*. 2017;49(6):670-8.
141. Hipoxia cerebral MedlinePlus: MedlinePlus enciclopedia médica A.D.A.M; 2022 [updated 7/26/2022. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001435.htm#:~:text=Las%20c%C3%A9lulas%20del%20cerebro%20son,muerte%20o%20da%C3%B1o%20cerebral%20grave>.
142. Walz W. *Cerebral Ischemia: Molecular and Cellular Pathophysiology*: Springer Science & Business Media; 1999.
143. Di Domenico F, Casalena G, Jia J, Sultana R, Barone E, Cai J, et al. Sex differences in brain proteomes of neuron-specific STAT3-null mice after cerebral ischemia/reperfusion. *Journal of neurochemistry*. 2012;121(4):680-92.
144. Wu M-Y, Yiang G-T, Liao W-T, Tsai AP-Y, Cheng Y-L, Cheng P-W, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;46(4):1650-67.
145. Arango-Dávila C, Escobar-Betancourt M, Cardona-Gómez G, Pimienta-Jiménez H. Fisiopatología de la isquemia cerebral focal: aspectos básicos y proyección a la clínica. *Rev Neurol*. 2004;39(2):156-65.
146. Kumar V, Abbas AK. *Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional*: Elsevier Health Sciences; 2021.
147. McDonald ES, Windebank AJ. Mechanisms of neurotoxic injury and cell death. *Neurologic clinics*. 2000;18(3):525-40.
148. Jander S, Kraemer M, Schroeter M, Witte OW, Stoll G. Lymphocytic infiltration and expression of intercellular adhesion molecule-1 in photochemically induced ischemia of the rat cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1995;15(1):42-51.
149. Carmichael ST, Kathirvelu B, Schweppe CA, Nie EH. Molecular, cellular and functional events in axonal sprouting after stroke. *Experimental neurology*. 2017;287:384-94.

150. Auriel E, Bornstein N. Neuroprotection in acute ischemic stroke—current status. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(9):2200-2.
151. Watts N, Amann M, Ayeb-Karlsson S, Belesova K, Bouley T, Boykoff M, et al. The Lancet Countdown on health and climate change: from 25 years of inaction to a global transformation for public health. *The Lancet*. 2018;391(10120):581-630.
152. Yic CD, Gindel D, Pontet J, Cancela M. Golpe de calor. *Revista Argentina de Terapia Intensiva*. 2016;33(4).
153. Hifumi T, Kondo Y, Shimizu K, Miyake Y. Heat stroke. *Journal of intensive care*. 2018;6(1):1-8.
154. Lobo Núñez E. Termorregulación en el adulto. Actuación ante la hipotermia y el golpe de calor. 2014.
155. Lipman GS, Eifling KP, Ellis MA, Gaudio FG, Otten EM, Grissom CK. Wilderness Medical Society practice guidelines for the prevention and treatment of heat-related illness: 2014 update. *Wilderness Environ Med*. 2014;25(4 Suppl):S55-65.
156. Leon LR, Bouchama A. Heat stroke. *Compr Physiol*. 2015;5(2):611-47.
157. Leon LR, Helwig BG. Heat stroke: role of the systemic inflammatory response. *J Appl Physiol* (1985). 2010;109(6):1980-8.
158. Giorgini P, Di Giosia P, Petrarca M, Lattanzio F, Stamerra CA, Ferri C. Climate changes and human health: a review of the effect of environmental stressors on cardiovascular diseases across epidemiology and biological mechanisms. *Current pharmaceutical design*. 2017;23(22):3247-61.
159. Giorgini P, Di Giosia P, Petrarca M, Lattanzio F, Stamerra CA, Ferri C. Climate Changes and Human Health: A Review of the Effect of Environmental Stressors on Cardiovascular Diseases Across Epidemiology and Biological Mechanisms. *Curr Pharm Des*. 2017;23(22):3247-61.

160. Shah ASV, Lee KK, McAllister DA, Hunter A, Nair H, Whiteley W, et al. Short term exposure to air pollution and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2015;350(mar23 11):h1295.
161. Zhang R, Liu G, Jiang Y, Li G, Pan Y, Wang Y, et al. Acute effects of particulate air pollution on ischemic stroke and hemorrhagic stroke mortality. *Frontiers in neurology*. 2018;9:827.
162. García Pastor A, López-Cancio Martínez E, Rodríguez-Yáñez M, Alonso de Leciñana M, Amaro S, Arenillas JF, et al. Recommendations of the Spanish Society of Neurology for the prevention of stroke. Interventions on lifestyle and air pollution. *Neurologia (Engl Ed)*. 2021;36(5):377-87.
163. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(21):2331-78.
164. Mustafic H, Jabre P, Caussin C, Murad MH, Escolano S, Tafflet M, et al. Main air pollutants and myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2012;307(7):713-21.
165. Giorgini P, Di Giosia P, Grassi D, Rubenfire M, Brook RD, Ferri C. Air Pollution Exposure and Blood Pressure: An Updated Review of the Literature. *Curr Pharm Des*. 2016;22(1):28-51.
166. Miller MR, Shaw CA, Langrish JP. From particles to patients: oxidative stress and the cardiovascular effects of air pollution. *Future Cardiol*. 2012;8(4):577-602.
167. Miller MR. The role of oxidative stress in the cardiovascular actions of particulate air pollution. *Biochem Soc Trans*. 2014;42(4):1006-11.
168. Langrish JP, Bosson J, Unosson J, Muala A, Newby DE, Mills NL, et al. Cardiovascular effects of particulate air pollution exposure: time course and underlying mechanisms. *J Intern Med*. 2012;272(3):224-39.

169. Peters A, Döring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet*. 1997;349(9065):1582-7.
170. Ghio AJ, Kim C, Devlin RB. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(3 Pt 1):981-8.
171. Aránguez E, Ordóñez JM, Serrano J, Aragonés N, Fernández-Patier R, Gandarillas A, et al. Contaminantes atmosféricos y su vigilancia. *Revista Española de Salud Pública*. 1999;73:123-32.
172. Belkin M, Césarini J, Diffey B, Hietanen M, Kojima M, Mariutti G, et al. Protection against exposure to ultraviolet radiation. World Health Organization, United Nations Environment Programme August. 1994.
173. Hussein A, Elhassaneen Y. Natural dye from red onion skins and applied in dyeing cotton fabrics for the production of women's headwear resistance to ultraviolet radiation (UVR). *The Journal of American Science*. 2014;10(3):129-39.
174. Lucas R, Norval M, Neale R, Young A, De Gruijl F, Takizawa Y, et al. The consequences for human health of stratospheric ozone depletion in association with other environmental factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2015;14(1):53-87.
175. De Jager T, Cockrell A, Du Plessis S. Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*. 2017:15-23.
176. Varón Plata CL, Jaramillo Ángel S, Tello Hernández A. La retina para el médico no oftalmólogo. 2010.
177. González Sánchez LR. Conocimiento sobre el daño ocular causado por radiaciones ultravioleta en la población estudiantil del colegio departamental de Cucaita, Boyacá Un modelo de educación para la prevención. 2007.
178. Qi X, Zhang Y, Guo H, Hai Y, Luo Y, Yue T. Mechanism and intervention measures of iron side effects on the intestine. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2020;60(12):2113-25.

179. Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. UVB Light Stimulates Production of Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(25):22432-6.
180. Shang L, Mao D, Li Z, Gao X, Deng J. Neuroglobin Is Involved in the Hypoxic Stress Response in the Brain. *BioMed Research International*. 2022;2022.
181. Fordel E, Geuens E, Dewilde S, De Coen W, Moens L. Hypoxia/ischemia and the regulation of neuroglobin and cytoglobin expression. *IUBMB life*. 2004;56(11-12):681-7.
182. Liu N, Yu Z, Gao X, Song Y, Yuan J, Xun Y, et al. Establishment of cell-based neuroglobin promoter reporter assay for neuroprotective compounds screening. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)*. 2016;15(5):629-39.
183. Ren C, Wang P, Wang B, Li N, Li W, Zhang C, et al. Limb remote ischemic pre-conditioning in combination with post-conditioning reduces brain damage and promotes neuroglobin expression in the rat brain after ischemic stroke. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 2015;33(3):369-79.
184. Shang A, Zhou D, Wang L, Gao Y, Fan M, Wang X, et al. Increased neuroglobin levels in the cerebral cortex and serum after ischemia–reperfusion insults. *Brain research*. 2006;1078(1):219-26.
185. Song X, Xu R, Xie F, Zhu H, Zhu J, Wang X. Hemin offers neuroprotection through inducing exogenous neuroglobin in focal cerebral hypoxic-ischemia in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2014;7(5):2163.
186. S Pandya R, Mao L, Zhou H, Zhou S, Zeng J, John Popp A, et al. Central nervous system agents for ischemic stroke: neuroprotection mechanisms. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)*. 2011;11(2):81-97.
187. Hota KB, Hota SK, Srivastava RB, Singh SB. Neuroglobin regulates hypoxic response of neuronal cells through Hif-1  $\alpha$ -and

- Nrf2-mediated mechanism. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2012;32(6):1046-60.
188. Emara M, Salloum N, Allalunis-Turner J. Expression and hypoxic up-regulation of neuroglobin in human glioblastoma cells. *Molecular Oncology*. 2009;3(1):45-53.
189. Khan AA, Wang Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Miles E, et al. Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(47):17944-8.
190. Wang X, Liu J, Zhu H, Tejima E, Tsuji K, Murata Y, et al. Effects of neuroglobin overexpression on acute brain injury and long-term outcomes after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2008;39(6):1869-74.
191. Schneuer M, Flachsbarth S, Czech-Damal NU, Folkow LP, Siebert U, Burmester T. Neuroglobin of seals and whales: evidence for a divergent role in the diving brain. *Neuroscience*. 2012;223:35-44.
192. Sun Y, Jin K, Peel A, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(6):3497-500.
193. Gorabi AM, Aslani S, Barreto GE, Báez-Jurado E, Kiaie N, Jamialahmadi T, et al. The potential of mitochondrial modulation by neuroglobin in treatment of neurological disorders. *Free Radical Biology and Medicine*. 2021;162:471-7.
194. Yu Z, Zhang Y, Liu N, Yuan J, Lin L, Zhuge Q, et al. Roles of neuroglobin binding to mitochondrial complex III subunit cytochrome c 1 in oxygen-glucose deprivation-induced neurotoxicity in primary neurons. *Molecular Neurobiology*. 2016;53:3249-57.
195. Chen LM, Xiong YS, Kong FL, Qu M, Wang Q, Chen XQ, et al. Neuroglobin attenuates Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating Akt signaling. *Journal of neurochemistry*. 2012;120(1):157-64.
196. Wang J-y, Shen J, Gao Q, Ye Z-g, Yang S-y, Liang H-w, et al. Ischemic postconditioning protects against global cerebral

ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke*. 2008;39(3):983-90.

197. Raida Z, Hundahl CA, Nyengaard JR, Hay-Schmidt A. Neuroglobin over expressing mice: expression pattern and effect on brain ischemic infarct size. *PLoS One*. 2013;8(10):e76565.

198. Lee HM, Greeley Jr GH, Englander EW. Transgenic overexpression of neuroglobin attenuates formation of smoke-inhalation-induced oxidative DNA damage, in vivo, in the mouse brain. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(12):2281-7.

199. Duong TTH, Witting PK, Antao ST, Parry SN, Kennerson M, Lai B, et al. Multiple protective activities of neuroglobin in cultured neuronal cells exposed to hypoxia re-oxygenation injury. *Journal of neurochemistry*. 2009;108(5):1143-54.

200. Wen H, Liu L, Zhan L, Liang D, Li L, Liu D, et al. Neuroglobin mediates neuroprotection of hypoxic postconditioning against transient global cerebral ischemia in rats through preserving the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPases. *Cell death & disease*. 2018;9(6):635.

201. Yu Z, Cheng C, Liu Y, Liu N, Lo EH, Wang X. Neuroglobin promotes neurogenesis through Wnt signaling pathway. *Cell death & disease*. 2018;9(10):945.

202. Warner HR, Hodes RJ, Pocinki K. What does cell death have to do with aging? *Journal of the American Geriatrics Society*. 1997;45(9):1140-6.

203. McCarthy D, Wang P-L. Mortality postponement and compression at older ages in human cohorts. *PLOS ONE*. 2023;18(3):e0281752.

204. Pyrkov TV, Avchaciov K, Tarkhov AE, Menshikov LI, Gudkov AV, Fedichev PO. Longitudinal analysis of blood markers reveals progressive loss of resilience and predicts human lifespan limit. *Nature Communications*. 2021;12(1).

205. Sun Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Peel A, Childs JT, et al. Effect of aging on neuroglobin expression in rodent brain. *Neurobiol Aging*. 2005;26(2):275-8.

206. Picotti P, Dewilde S, Fago A, Hundahl C, De Filippis V, Moens L, et al. Unusual stability of human neuroglobin at low pH--molecular mechanisms and biological significance. *Febs j.* 2009;276(23):7027-39.

207. Blanch AR. Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. *Nota d'economia.* 2010;3:183-98.