

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



**LA CAFEÍNA MODULA EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE
Yarrowia lipolytica.**

Por

MARIPAZ CASTILLO ROQUE

**Como requisito parcial para obtener el Grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

Mayo, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



LA CAFEÍNA MODULA EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE
***Yarrowia lipolytica*.**

Por

MARIPAZ CASTILLO ROQUE

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

Monterrey, Nuevo León

Mayo, 2022

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA

**LA CAFEÍNA MODULA EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE
Yarrowia lipolytica.**

Dr. Eduardo Campos Góngora

DIRECTOR

APROBACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA

**LA CAFEÍNA MODULA EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE DE
Yarrowia lipolytica.**

Comité de tesis

Dr. Zacarías Jiménez Salas
PRESIDENTE

Dr. Eduardo Campos Góngora
SECRETARIO

MCN. Gerardo I. Arredondo Mendoza
VOCAL

DEDICATORIA

A mi familia:

José Isabel Castillo Moreno

Rosario Roque Guillen

Diana Isabel Castillo Roque

Ramiro Guadalupe Salazar Huerta

Aquiles Paz Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis compañeros de laboratorio: Maricela, Gerardo, Ale, Roberto, y Abad, quienes aún a distancia estuvieron apoyándome y brindándome su amistad durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de generación con quienes compartí grandes momentos desde el inicio y que se convirtieron en grandes amigos: Deisy, Stefy, Víctor, Roberto, David, Maye, Cecy y Andrea.

A mis maestros quienes me enseñaron y brindaron su apoyo y amistad, el Dr. Zacarías Jiménez Salas y el Dr. Heriberto Castro García. Al Dr. Eduardo que me abrió las puertas de su laboratorio desde el 2018 y ha seguido enseñándome hasta ahora, gracias por su apoyo y por aceptar mis errores.

A mis grandes amigas que han seguido a mi lado desde que iniciamos la licenciatura en nutrición: Oneida, Karla, Sol, Vanesa, Daniel y Kenia, las quiero muchísimo.

A mis padres Rosario y José Isabel, que me han enseñado los valores con los que he podido crecer personal y profesionalmente, por siempre apoyarme en la realización de mis metas y enseñarme con su ejemplo a no tener miedo de buscar lo que quiero. A Diana y a Ramiro que siempre han estado ahí para apoyar mis decisiones y festejar mis logros.

A Aquiles por compartir su vida conmigo y apoyarme en que siga realizando mis metas.

Tabla de contenido

LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS	5
NOMENCLATURA.....	6
1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	10
2.1. Definición del problema	12
2.2. Justificación	13
3. HIPÓTESIS.....	14
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. Objetivo general.....	14
4.2. Objetivos específicos.....	14
5. ANTECEDENTES.....	15
5.1. Historia y consumo de la cafeína.....	15
5.2. La molécula de cafeína.....	15
5.3. Propiedades físicas de la cafeína	16
5.4. Metabolismo de la cafeína	17
5.5. Efectos fisiológicos de la cafeína en el ser humano	18
5.6. Estrés oxidativo	20
5.7. Sistema de defensa antioxidante.....	22
5.7.1 Enzimas antioxidantes	24
5.7.1.1. Superóxido dismutasa	25
5.7.1.2. Glutación peroxidasa	25
5.7.1.3. Catalasa.....	26
5.8. Cafeína y efecto antioxidante	26

5.9.	Daño al ADN.....	27
5.10.	ADN y cafeína	28
5.11.	La levadura como modelo de estudio.....	29
5.12.	Estrés oxidativo en <i>Y. lipolytica</i>	30
5.13.	Efecto de la cafeína en <i>Y. lipolytica</i>	30
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	31
6.1.	Material.....	31
6.1.1.	Material químico	31
6.1.2.	Material biológico	31
6.2.	Métodos.....	31
6.2.1.	Diseño del estudio.....	31
6.2.2.	Estrategia general	32
6.3.	Procedimiento experimental	33
6.3.1.	Cultivo celular y tratamientos	33
6.3.1.1.	Preparación de los medios de cultivo	33
6.3.1.2.	Preparación y ajuste del preinóculo según la OD	33
6.3.1.3.	Preparación del inóculo	34
6.3.1.4.	Tratamiento con cafeína	34
6.3.1.5.	Tratamiento con peróxido	34
6.3.2.	Obtención y procesamiento del material genético.....	35
6.3.2.1.	Extracción de ácidos nucleicos	35
6.3.2.2.	Cuantificación y ajuste de la concentración de ácidos nucleicos.....	36
6.3.2.3.	Obtención del ARNm	36
6.3.2.4.	Síntesis de ADNc.....	37
6.3.3.	Análisis de la expresión de genes por RT-PCR	39

6.3.3.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	39
6.3.3.2.	Electroforesis en geles de agarosa	40
6.3.3.3.	Obtención de los valores de expresión por densitometría de banda	41
6.3.4.	Análisis estadístico.....	41
7.	RESULTADOS	42
7.1.	Estandarización de las condiciones de PCR	42
7.2.	Aislamiento de ARN.....	43
7.3.	Obtención de ADN complementario (ADNc).....	44
7.4.	Análisis de la expresión de genes de respuesta antioxidante.....	44
7.4.1.	Análisis de la expresión de genes en respuesta al tratamiento con cafeína	45
7.4.2.	Análisis de la expresión de genes en respuesta al tratamiento con H ₂ O ₂	47
7.4.3.	Análisis de la expresión de genes en respuesta al tratamiento con cafeína y H ₂ O ₂	48
7.4.4.	Análisis de la expresión de genes a los 15 min de incubación con los diferentes tratamientos.....	50
8.	DISCUSIÓN	53
9.	CONCLUSIONES	62
10.	REFERENCIAS	63
11.	ANEXOS	82
	Anexo 1	82

LISTA DE FIGURAS

Figura.....	Página
1. Estructura química de la cafeína (Oñatibia-Astibia <i>et al.</i> , 2016)	16
2. Antioxidantes y prooxidantes de fuentes endógenas y exógenas (Sies <i>et al.</i> , 2018).....	23
3. Primera línea de defensa antioxidante (Ighodaro & Akinloye, 2018).	24
4. Estrategia general de trabajo.	32
5. PCR de los genes <i>ACT</i> , <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> , <i>GPX</i> , <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i> amplificados en ADN.	43
6. Comprobación de la efectividad del tratamiento con DNasa.	44
7. Expresión de los genes <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> , <i>GPX</i> , <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> tratadas con cafeína durante diferentes tiempos.	46
8. Expresión de los genes <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> , <i>GPX</i> , <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> tratadas con H ₂ O ₂ durante diferentes tiempos.....	48
9. Expresión de los genes <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> , <i>GPX</i> , <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> tratadas con cafeína y H ₂ O ₂ durante diferentes tiempos.	49
10. Expresión de los genes <i>SOD1</i> y <i>SOD2</i> a los 15 min de incubación con cada tratamiento.	50
11. Expresión del gen <i>GPX</i> a los 15 min de incubación con cada tratamiento.	51
12. Expresión de los genes <i>CAT1</i> , <i>CAT2</i> y <i>CAT3</i> a los 15 min de incubación con cada tratamiento.	52

LISTA DE TABLAS

Tabla.....	Página
1. Componentes de la reacción con la enzima DNasa	37
2. Componentes de las reacciones con la enzima RT	38
3. Condiciones de la reacción de RT	38
4. Componentes de la reacción de PCR.....	39
5. Condiciones de la reacción de PCR	40
6. Características de los oligonucleótidos utilizados para la PCR.....	42

NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
µl	Microlitros
µm	Micrómetros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AN	Ácidos Nucleicos
ARN	Ácido ribinucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
CAT	Catalasa
<i>CAT</i>	Gen que codifica para catalasa
DE	Desviación estándar
EO	Estrés oxidative
ERO	Especies reactivas de oxígeno
<i>et al</i>	et alii (... y otros)
g	Gramos
GPX	Glutación peroxidasa
<i>GPX</i>	Gen que codifica para glutación peroxidasa
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada

<i>KU80</i>	Gen que codifica para la proteína KU80
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanometros
OD	Densidad óptica
PCR	Polymerase chain reaction, Reacción en cadena de la polimerasa
<i>RAD52</i>	Gen que codifica para la proteína RAD52
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Reverse transcription, Transcripción reversa
SOD	Superoxido dismutasa
<i>SOD</i>	Gen que codifica para superoxido dismutasa
YPD	Medio de cultivo con levadura, peptona y dextrosa
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN

El ADN contiene información genética constantemente expuesta a daños ocasionados por agentes internos y externos, entre los que se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas especies en cantidades normales ayudan al correcto desarrollo de los mecanismos celulares, sin embargo, en altas cantidades pueden provocar daño a biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y estrés oxidativo (EO). Para contrarrestar el posible daño ocasionado por las ERO, la célula cuenta con un mecanismo de defensa antioxidante que se encarga de mantener el balance entre moléculas oxidantes y antioxidantes, este consiste en elementos enzimáticos (catalasa y superóxido dismutasa) y no enzimáticos (glutatión peroxidasa). El impacto que tiene el EO sobre la salud ha impulsado la necesidad de buscar elementos provenientes de la dieta que tengan efectos antioxidantes y que contribuyan a mantener un equilibrio entre la producción y captación de ERO. Entre ellos está la cafeína, un alcaloide altamente consumido por la población mundial y que ha sido ampliamente estudiado para definir su efecto prooxidante o antioxidante.

Es por lo anterior que se planteó como objetivo de este proyecto analizar los cambios producidos por el efecto de la cafeína sobre la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante en células de *Yarrowia lipolytica*.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa P01a de *Y. lipolytica* incubada en medio YPD adicionado con; Cafeína, H₂O₂ y cafeína + H₂O₂, a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min). Se analizó la expresión de los genes *SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* por RT-PCR y densitometría.

La expresión de los genes mostró un incremento tras 15 y 30 min de tratamiento con cafeína. Mientras que el H₂O₂ produjo un incremento a partir de los 10 min, la combinación de ambos elementos no produjo mayores cambios a los mostrados por la administración de los agentes de forma individual, lo que descarta un efecto sinérgico.

Con base a los resultados obtenidos, se sugiere la participación de la cafeína como antioxidante en el sistema regulatorio de *Yarrowia lipolytica* ejerciendo un efecto indirecto modulando la expresión de los genes participantes en el sistema de defensa antioxidante.

2. INTRODUCCIÓN

La integridad del genoma de un organismo es puesta a prueba constantemente por agentes dañinos que pueden ser de origen exógeno o endógeno. Los productos del metabolismo celular, como las especies reactivas de oxígeno (ERO) son agentes endógenos que en cantidades normales regulan los procesos metabólicos de la célula, por el contrario, en grandes cantidades pueden generar daño a biomoléculas como proteínas, lípidos, ADN y ocasionar estrés oxidativo (EO) relacionado con el envejecimiento y con algunas enfermedades como la diabetes mellitus y el cáncer.

Para mantener el equilibrio entre la producción y captación de ERO, y el daño ocasionado por su acumulación, las células han desarrollado un sofisticado mecanismo en el que superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa conforman la primera línea de defensa antioxidante; sin embargo, en los últimos años se han estudiado algunos componentes de la dieta que puedan tener efectos antioxidantes para contrarrestar el EO y la producción de ERO, entre ellos se encuentra la cafeína.

La cafeína tiene un largo historial de consumo debido a que forma parte de una gran variedad de productos, llegando a más del 80% de la población mundial ya sea en forma de café, té o algunas otras bebidas que la contienen. Se le han atribuido efectos como, evitar la somnolencia, acelerar el metabolismo, así como un efecto estimulante sobre el sistema nervioso central. Mientras que algunos autores le han atribuido un potencial efecto antioxidante otros le atribuyen un efecto prooxidante dependiente de la dosis y, debido a su amplio consumo, es importante determinar si sus efectos son positivos o negativos para el organismo.

Con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre los efectos antioxidantes de la cafeína en el presente trabajo se analizó el efecto de la cafeína sobre la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante (*SOD1*, *SOD2*,

CAT1, *CAT2*, *CAT3* y *GPX*) utilizando como organismo modelo la cepa P01a de la levadura *Yarrowia lipolytica* cultivada en medio YPD adicionado con cafeína, H₂O₂ o cafeína + H₂O₂ durante diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min) con la finalidad de determinar el patrón de expresión de cada gen.

2.1. Definición del problema

La cafeína es una sustancia de alto consumo a nivel mundial; sin embargo, sus efectos sobre el organismo aun no son claros ya que se le han atribuido efectos tanto positivos (estimulante de sistema nervioso central, disminuir el riesgo a padecer diabetes tipo 2, entre otros) como negativos (daño citotóxico y daño genotóxico). Desde otro punto de vista, también se le han atribuido efectos tanto antioxidantes como prooxidantes (Barcelos *et al.*, 2020). Aunque se ha visto que la concentración 5 mM es capaz de inhibir la expresión de genes implicados en los mecanismos de reparación del daño al ADN (Castillo, 2020), no hay evidencia que indique un daño directo sobre el ADN.

Se ha propuesto que la cafeína tiene efectos negativos sobre la salud—principalmente asociados con el daño al ADN—, sin embargo, se desconoce si tales efectos se deben a la acción directa de la cafeína sobre el ADN o a su acción indirecta a través de la generación de metabolitos celulares, como las especies reactivas de oxígeno las cuales tienen la capacidad de generar daño a biomoléculas: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Ighodaro, 2018; Magwood *et al.*, 2020). Es posible que el metabolismo de la cafeína aumente la generación de ERO y como consecuencia provoque daño al ADN.

2.2. Justificación

La cafeína es un compuesto bioactivo que se encuentra en una gran variedad de alimentos por lo que es ampliamente consumida a nivel mundial (Martyn *et al.*, 2018). Aunque se han realizado un sinnúmero de estudios para tratar de dilucidar el efecto que la cafeína tiene sobre el organismo, los resultados han sido contradictorios, observándose efectos tanto perjudiciales (prooxidantes) como benéficos (antioxidantes).

En células de *Y. lipolytica* se ha observado que la cafeína (a concentración 5 mM) no daña directamente al ADN, sino que inhibe la expresión de los genes *RAD52* y *KU80* cuyos productos proteicos juegan un papel predominante en la reparación de ADN (Castillo, 2020). Como resultado de tales estudios surge la necesidad de investigar si la cafeína induce el incremento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (actividad prooxidante) y, que sean estas moléculas las responsables de ocasionar daño a las células, induciendo con ello la expresión de genes implicados en la respuesta celular antioxidante.

3. HIPÓTESIS

La cafeína modifica la expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante en células de *Y. lipolytica*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar el efecto de la cafeína sobre el patrón de expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante en células de *Y. lipolytica*.

4.2. Objetivos específicos

- Analizar la expresión de los genes *SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* en células de *Y. lipolytica* tratadas con:
 - a) Cafeína [5 mM]
 - b) H₂O₂ [5 mM]
 - c) Cafeína [5 mM] + H₂O₂ [5 mM]
- Determinar el patrón de expresión de cada gen con respecto al tiempo de exposición de las células a los diferentes tratamientos.
- Comparar la expresión de cada gen en las células sometidas a los diferentes tratamientos.

5. ANTECEDENTES

5.1. Historia y consumo de la cafeína

La cafeína es un alcaloide presente en una gran variedad de productos como café, té, algunas bebidas suaves, productos con cacao o chocolate e incluso medicamentos y suplementos (Martyn *et al.*, 2018; Barcelos *et al.*, 2020). Es un constituyente natural presente en más de 60 especies de plantas y es considerada la sustancia estimulante de mayor consumo (Pardo *et al.*, 2007).

Debido a que está presente en una gran variedad de productos, la cafeína es considerada la sustancia psicoactiva más utilizada y se estima que el 80% de la población mundial la consume (Wilson, 2018). Algunos estudios incluso la consideran como la sustancia farmacológicamente activa que altera el estado de ánimo de mayor consumo en la población mundial (Gaspar & Ramos, 2016; Nawrot *et al.*, 2010). Se ha reportado que el 80% de la población adulta en todo el mundo consume alrededor de 200-250 mg de cafeína al día, se estima que el consumo de cafeína, en todas las edades, es en promedio de 165 mg/día de los cuales 105 mg son asociados al consumo de café (Wikoff *et al.*, 2017; Morde *et al.*, 2021).

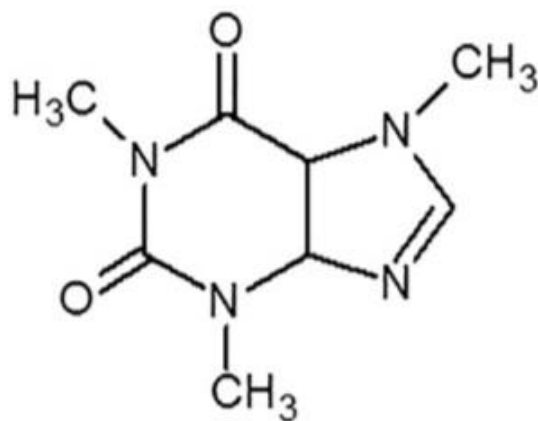
Hay un creciente interés público y científico sobre las potenciales consecuencias en la salud del consumo habitual de bebidas que contienen cafeína; rigurosos estudios sobre la toxicidad de la cafeína concluyen que el consumo de no más de 400 mg/día no está asociado con efectos adversos en adultos sanos, sin embargo, el consumo elevado por encima de esta dosis puede ser perjudicial (Reyes & Cornelis, 2018).

5.2. La molécula de cafeína

Fue descubierta hace aproximadamente más de 2000 años en Etiopía y probablemente fue ahí donde se reconocieron por primera vez sus efectos energizantes (Stefanello *et al.*, 2019). Sin embargo, no fue sino hasta principios

del siglo XIX que la molécula de cafeína fue aislada y nombrada así por el físico Friedlieb Ferdinand Runge (Weinberg & Bealer, 2002).

La cafeína (figura 1) es un derivado de las purinas cuya nomenclatura química IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) es 1, 3, 7 - trimetilxantina (Poltev *et al.*, 2004). Es un compuesto xantina alcaloide perteneciente a la familia de las metilxantinas, las cuáles son alcaloides estimulantes del sistema nervioso central (SNC) y está presente en algunas bebidas comerciales y medicinas por lo que su consumo es a través de diversos productos (Barcelos *et al.*, 2014).



Cafeína
(1, 3, 7- trimetilxantina)

Figura 1. Estructura química de la cafeína (Oñatibia-Astibia *et al.*, 2016)

5.3. Propiedades físicas de la cafeína

En estado puro y a temperatura ambiente la cafeína es un sólido cristalino blanco, inodoro y con sabor amargo en forma de agujas blancas o polvo (O'Neil, 2013). El punto de fusión de la cafeína es 238 °C y su punto de sublimación es 178 °C. Se disuelve bien en agua hirviendo, pero a temperatura ambiente el cloroformo es su mejor solvente (Ashihara & Suzuki, 2004).

5.4. Metabolismo de la cafeína

Después de su ingesta, la cafeína es rápidamente absorbida (casi el 100% de su biodisponibilidad) a nivel gastrointestinal, por lo que alcanza su máxima concentración en sangre en aproximadamente 1 hora (McLellan *et al.*, 2016; Stefanello *et al.*, 2019; Goldstein *et al.*, 2010). Es bien sabido que el metabolismo y la farmacocinética de la cafeína se ven afectados por diversos factores como edad, sexo, hormonas, enfermedad del hígado, obesidad, tabaquismo y dieta; en estudios genéticos se han identificado varios loci involucrados de manera crítica en el metabolismo de la cafeína y sus consecuencias fisiológicas (Nehlig, 2018). Una vez en torrente sanguíneo la cafeína es rápidamente distribuida a todos los tejidos y fácilmente cruza la barrera hematoencefálica (debido a esto es que puede tener un efecto sobre el SNC), además, la cafeína tiene una vida media dentro del sistema circulatorio de 3 a 5 horas (McLellan *et al.*, 2016). Se metaboliza principalmente en el hígado por el sistema oxidativo enzimático del citocromo P450 para formar tres metabolitos principales: 3, 7-dimetilxantina (teobromina, 12%); 1, 7-dimetilxantina (paraxantina, 84%) y 1, 3-dimetilxantina (teofilina, 4%) (Stefanello *et al.*, 2019; Oñatibia-Astibia *et al.*, 2016). El citocromo CYP1A2 es responsable de la dimetilación de la cafeína, sin embargo, su actividad enzimática puede verse influenciada por algunos factores como el sexo, raza, polimorfismos genéticos o enfermedades por lo que estos factores pueden afectar su metabolismo y por lo tanto su efecto en el organismo (Stefanello *et al.*, 2019).

Las paraxantinas, principales metabolitos formado a partir de la cafeína, son metabolizadas en otros compuestos por los citocromos CYP2A6, que forma 1, 7- dimetilurato, y CYP1A2, que forma 1-metilxantina y 5-acetilamino-6formilamino-3-metiluracil, este último catalizado por N-acetiltransferasa es un producto inestable que puede ser modificado de forma no enzimática a 5-acetilamino-6-amino-3-metiluracil. El 90% de 1, 7-dimetilurato es principalmente metabolizado por la enzima CYP2A6 y alrededor del 10% es metabolizado por

CYP1A2. Parte de 1-metilxantina es metabolizada a 1-metilurato por la xantina oxidasa (McLellan *et al.*, 2016).

5.5. Efectos fisiológicos de la cafeína en el ser humano

Estructuralmente la cafeína es similar a la adenosina, un neurotransmisor cuya formación depende de la tasa relativa de síntesis y degradación de ATP, Adenosín trifosfato (McLellan *et al.*, 2016), por lo que se le atribuyen algunos efectos sobre el SNC y están bien descritos sus mecanismos estimulantes sobre el cerebro (Stefanello *et al.*, 2019). Otras propiedades que se le atribuyen son evitar la somnolencia y estimular el metabolismo (Heckman *et al.*, 2010). Los efectos observados de la cafeína están relacionados a la dosis que se consume, es así como se han observado efectos positivos con una dosis menor a 400 mg y efectos negativos por encima de esta dosis (Wilson, 2018; Grgic *et al.*, 2020). Recientemente se ha sugerido que el consumo de dosis bajas de cafeína (100 mg) disminuyen el riesgo de aparición de síntomas relacionados con el deterioro de la función cognitiva (mantenimiento del balance, demandas locomotoras y mantenimiento de la postura) en adultos mayores (Kara *et al.*, 2018; Ben Waer *et al.*, 2020; Laatar *et al.*, 2021).

Se ha encontrado que la cafeína provoca una gran variedad de funciones biológicas en un amplio rango de dosis y se sugiere que puede tener un rol protector sobre el estrés oxidativo y el envejecimiento (Li *et al.*, 2018). Los estudios que se han realizado sugieren que para beneficiar el funcionamiento del corazón y tener un efecto sobre las enfermedades cardiovasculares, la cafeína (o cualquier sustancia bioactiva) debe tener participación sobre los factores de riesgo como son el metabolismo de lípidos, la presión arterial o brindar un efecto antioxidante a nivel fisiológico (Bonita *et al.*, 2007).

En términos generales los efectos fisiológicos del café son contradictorios ya que su consumo se ha relacionado con el incremento de la presión sanguínea, la resistencia a la insulina y el aumento en la concentración de lípidos en suero, además de mostrar un impacto significativo en el metabolismo de los

carbohidratos y de los lípidos así como en el sistema cardiovascular sin mostrar efectos claros sobre enfermedades cardiovasculares, arritmias o insuficiencia cardiaca (Shearer & Graham, 2014; Crippa *et al.*, 2014). Por el contrario, se ha demostrado que el consumo regular de café tostado en una mezcla con café verde puede disminuir la presión, diastólica y sistólica, así como la concentración de glucosa, la resistencia a la insulina, los niveles de triglicéridos y un porcentaje de la grasa corporal, lo cual puede ayudar a prevenir el síndrome metabólico (Sarriá *et al.*, 2018). Particularmente ha sido de mayor preocupación la tasa de ingesta de cafeína entre las poblaciones potencialmente vulnerables a los efectos negativos de su consumo como las mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, niños, adolescentes, adultos jóvenes, personas con problemas cardíacos u otras afecciones de salud subyacentes, como enfermedades mentales (Temple *et al.*, 2017; Reichert *et al.*, 2020).

Algunos estudios sugieren que el riesgo a padecer diabetes tipo 2 se reduce en aquellos individuos que consumen dos o más tazas de café al día (Ding *et al.*, 2014). Tales efectos positivos sobre el metabolismo se han asociado a su contenido de compuestos antioxidantes y antiinflamatorios (Buscemi *et al.*, 2016), aun así el consumo de café no puede disminuir el riesgo en individuos que llevan un estilo de vida negativo como el sedentarismo y obesidad (Shi *et al.*, 2013).

La cafeína es una sustancia ergogénica, es decir que aumenta la potencia muscular, por lo que es utilizada por los atletas para mejorar la resistencia y el rendimiento (Vieira *et al.*, 2018). Desde finales del siglo XIX se han realizado estudios para determinar el efecto de pequeñas dosis de cafeína para facilitar el trabajo muscular además de los beneficios que tienen las bebidas con cafeína en actividades deportivas (Cano-Marquina *et al.*, 2013).

Se ha sugerido que algunos otros componentes bioactivos del café, además de la cafeína, podrían estar atenuando los efectos negativos que se han visto sobre la glucemia ya que se ha observado que el ácido clorogénico interfiere en

algunos mecanismos de absorción de glucosa (Robertson *et al.*, 2015). Por otra parte, el exceso en la ingesta de cafeína puede llevar a un incremento en la actividad y concentración de catecolaminas mediada por la estimulación del sistema nervioso central, lo que puede resultar en arritmias ocasionadas por la intoxicación por cafeína y fibrilación ventricular (Tsujimoto *et al.*, 2017; Willson, 2018).

Adicionalmente, estudios recientes han descrito que la cafeína presenta actividad antioxidante y, por consecuencia, protege al organismo contra enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (León-Carmona & Galano, 2019).

5.6. Estrés oxidativo

El concepto de estrés oxidativo (EO) fue formulado por primera vez en 1985, desde entonces se ha utilizado en los campos de la medicina y la biología (Sies, 2018; Sies *et al.*, 2017). El EO es un concepto global definido como el desbalance entre moléculas oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes, que guía a una interrupción en la señalización y control redox (oxido-reducción) y finalmente al daño molecular (Sies, 2018). Tal condición está estrechamente relacionada con el envejecimiento y con algunas enfermedades como diabetes mellitus, aterosclerosis, artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer, Pákinson y cáncer (Magenta *et al.*, 2016; Metro *et al.*, 2017).

Las células y órganos, en su metabolismo aeróbico normal, están sujetos a una exposición continua a agentes oxidantes que provienen de fuentes endógenas y exógenas (Sies, 2018). Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son productos del metabolismo aeróbico que actúan como moléculas de señalización en una variedad de condiciones fisiológicas, incluyendo proliferación celular, crecimiento, diferenciación y muerte (Magenta *et al.*, 2016). El metabolismo oxidativo, particularmente del catabolismo de ácidos grasos y glucosa con la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa y la respiración mitocondrial requiere un continuo suministro de O₂ (Trayhurn, 2017). En el

metabolismo energético el O_2 funciona como un aceptor de electrones en la cadena respiratoria. Los pasos que ocurren durante el proceso de reducción del oxígeno tienen lugar en la mitocondria y durante este proceso se generan ERO (Perez *et al.*, 2019).

Las ERO son llamadas radicales libres ya que tienen un electrón libre que puede interactuar con otras moléculas, estas moléculas pueden ser: anión radical superóxido (O_2^\bullet), radical hidroxilo (OH^\bullet) y radical peroxil (ROO^\bullet). El peróxido de hidrogeno (H_2O_2), a diferencia de los radicales libres, es una molécula químicamente estable con capacidad oxidante (Sies *et al.*, 2017) y, al igual que el oxígeno libre y el peroxinitrito ($ONOO^-$), puede ser transformado fácilmente en un radical libre en condiciones fisiológicas (Yu *et al.*, 2017). Los electrones libres producidos a partir de estas moléculas bajo el metabolismo aeróbico normal de las células son fácilmente aceptados por el oxígeno para producir ERO (Wang & Dong, 2018).

La producción de ERO se incrementa en condiciones patológicas o en presencia de factores ambientales, como la exposición a la luz ultravioleta y el metabolismo de nutrientes (Magenta *et al.*, 2016). El incremento en los niveles de ERO tiene un gran impacto en el ambiente celular ya que pueden iniciar interacciones específicas con biomoléculas como el ADN, proteínas, lípidos y metabolitos (Ruyskensvelde *et al.*, 2018; Ighodaro, 2018; Van Houten *et al.*, 2018).

Para evitar el daño ocasionado por las ERO el organismo ha desarrollado complejos mecanismos de respuesta antioxidante que se basan en antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos los cuales actúan colectivamente contra los radicales libres para resistir sus efectos dañinos a las biomoléculas vitales y, en última instancia, a los tejidos corporales (Ighodaro & Akinloye, 2018).

5.7. Sistema de defensa antioxidante

Las reacciones redox (oxido-reducción) son las reacciones químicas más importantes en el organismo (Meng *et al.*, 2017). Con el objetivo de mantener la homeostasis en el balance redox (es decir, el balance entre las ERO y su degradación), los organismos cuentan con un sistema llamado defensa celular antioxidante (Sies, 2018). En otro sentido se puede decir que las ERO también generan un ambiente protector para la célula ya que activan la respuesta antioxidante lo que permite que se restablezca, o se mantenga, la homeostasis oxido-reducción (Espinosa-Diez *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2017). Las células en su metabolismo aeróbico normal generan agentes oxidantes, aunque también se conocen fuentes exógenas que aumentan la producción de radicales libres. De igual forma las moléculas antioxidantes se pueden encontrar de manera natural en la célula u obtenerse de fuentes externas (Figura 2) (Sies *et al.*, 2018).

Los antioxidantes son aquellas sustancias que previenen la oxidación de algún sustrato a través de diferentes mecanismos ya sea la captación de radicales libres (antioxidante primario) o por un mecanismo indirecto de captación que sucede cuando el antioxidante necesita la unión de iones metálicos para su función (antioxidante secundario) (Vieira & Santos, 2017; Gulcin, 2020). Por otra parte, el sistema de defensa antioxidante consiste en elementos enzimáticos y no enzimáticos, entre los no enzimáticos se encuentran las vitaminas C y E, carotenoides y flavonoides, mientras que entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, entre otros (Meng *et al.*, 2017).

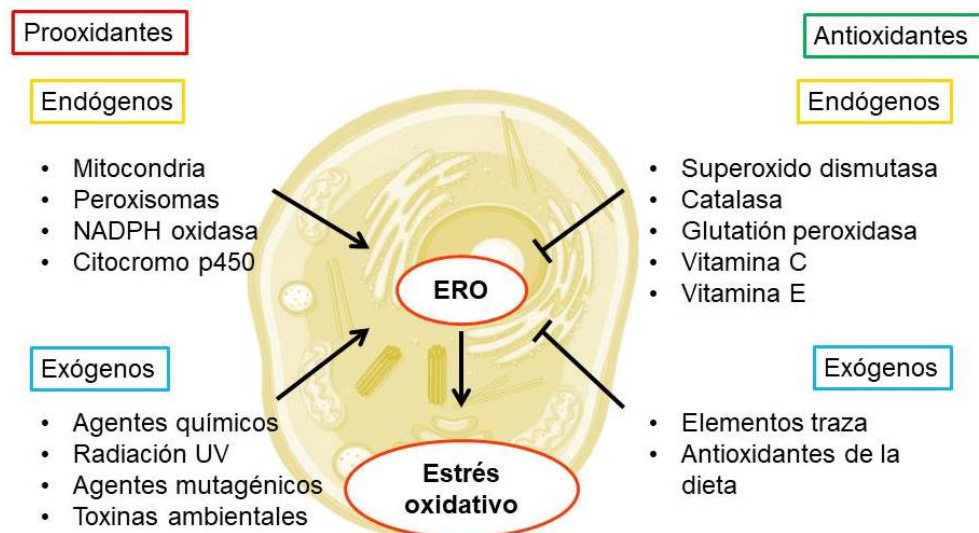


Figura 2. Antioxidantes y prooxidantes de fuentes endógenas y exógenas (Sies *et al*, 2018).

En el caso de los antioxidantes primarios, los cuales por lo general provienen de la dieta, se consideran tres mecanismos por los cuales ejercen su función. El primero y más común es el de captación de radicales libres que sucede cuando una molécula es considerada como antioxidante por su capacidad de donar electrones al radical libre y brindarle estabilidad de esta forma se evita que el agente oxidante dañe al objetivo biológico (Gulcin, 2020). El segundo mecanismo es el de reparación, ya que un antioxidante tiene la capacidad de disminuir la oxidación de un objetivo biológico ya dañado por el agente oxidante. El tercer mecanismo es el efecto cascada en el que otras moléculas derivadas del antioxidante, una vez que este ya realizó la función de captación o reparación, funcionan de nueva cuenta como captadores o reparadores formando una cascada de protección antioxidante (Vieira & Santos, 2017; Hunyadi, 2019). La cafeína ha mostrado tener un efecto sobre la captación de radicales libres, sin embargo, su efecto como molécula reparadora aún no ha sido comprobado. Se ha visto que los productos que se generan después de que la cafeína ejerció su función de captación de radicales libres pueden fungir como reparadores del objetivo biológico, es decir este efecto antioxidante es a través del efecto cascada (Vieira *et al.*, 2020). Por otro lado, los antioxidantes

secundarios son, por lo general, de origen enzimático y estos constituyen la primera línea de defensa antioxidante (Gulcin, 2020; Ighodaro & Akinloye, 2018).

5.7.1 Enzimas antioxidantes

La primera línea de defensa antioxidante (Figura 3) es un grupo de enzimas que actúa para suprimir o prevenir la formación de radicales libres o ERO en las células (Ighodaro & Akinloye, 2018).

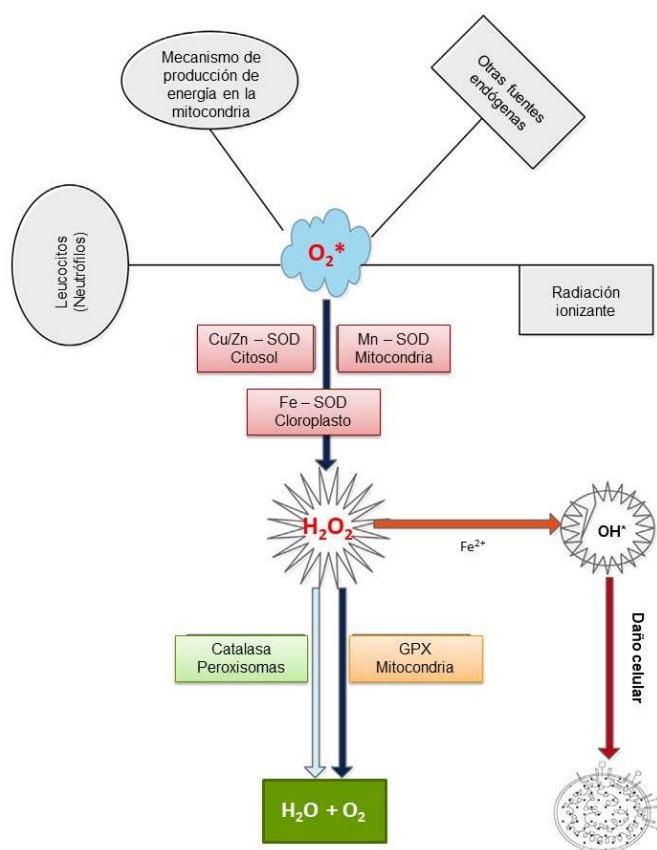


Figura 3. Primera línea de defensa antioxidante (Ighodaro & Akinloye, 2018).

Esta línea de defensa antioxidante involucra a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) (Papas *et al.*, 2019; Ighodaro & Akinloye, 2018). Estas enzimas eliminan a los radicales

superóxido y rompen moléculas como el peróxido de hidrógeno a moléculas que no ocasionan daño (Ighodaro & Akinloye, 2018).

5.7.1.1. Superóxido dismutasa

Las enzimas que actúan como primera línea de defensa antioxidante requieren de la unión de cofactores metálicos para catalizar las reacciones redox (Griess *et al.*, 2019). Superóxido dismutasa (SOD) es el más poderoso antioxidante que actúa como primera línea de defensa contra las ERO ya que es la primera enzima encargada de detoxificar a las células utilizando los iones hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu) y manganeso (Mn) formando las isoenzimas Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD; las cuales son codificadas por los genes *SOD1*, *SOD2* y *SOD3*, respectivamente (Ighodaro & Akinloye, 2018). SOD es una de las enzimas esenciales en el sistema de defensa antioxidante, cuya actividad de enfoca en la eliminación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), molécula que se genera de forma constante a través de procesos endógenos y fuentes exógenas (Griess *et al.*, 2019; Ighodaro & Akinloye, 2018).

5.7.1.2. Glutación peroxidasa

Glutación peroxidasa (GPX) es una de las enzimas más importantes para la protección antioxidante y la desintoxicación debido a que regula directamente la cantidad de ERO que se encuentran en el ambiente celular (Li *et al.*, 2015). Representa a una importante familia de enzimas antioxidantes que catalizan una reacción de oxidación de glutación a glutación disulfuro utilizando para ello H_2O_2 (Farina & Aschner, 2019). A nivel celular se encuentra principalmente en las mitocondrias y en algunas ocasiones en el citosol, su actividad depende de un cofactor micronutriente conocido como selenio por lo que comúnmente se le conoce como seleniocisteína peroxidasa; GPX juega un rol importante en la inhibición del proceso de peroxidación de lípidos y por lo tanto protege a las células del EO (Ighodaro & Akinloye, 2018).

5.7.1.3. Catalasa

Catalasas (CAT) son enzimas que utilizan hierro o manganeso como cofactores, y son altamente eficientes ya que se encuentran de manera abundante en diversos tejidos celulares y se localizan principalmente en los peroxisomas, aunque se ha descrito que están ausentes en las mitocondrias de las células de mamíferos (Ighodaro & Akinloye, 2018). Estas enzimas tienen como objetivo catalizar la descomposición de H_2O_2 en agua y oxígeno molecular (Bianchi *et al.*, 2019; Gebicka & Krych-Madej, 2019). CAT es una familia de enzimas clave que muchas especies utilizan para controlar el nivel intracelular de peróxido de hidrógeno, por otra parte, se ha sugerido que el rol de CAT es de alguna forma auxiliar al rol de GPX debido a que actúan de forma paralela en la síntesis de agua y oxígeno libre a partir de H_2O_2 , CAT en los peroxisomas y GPX en las mitocondrias (Bianchi *et al.*, 2019; Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018).

5.8. Cafeína y efecto antioxidante

El término "antioxidante" es generalmente usado tanto para actividades antioxidantes como para actividades antirradicales; sin embargo, mientras que la actividad antioxidante representa la capacidad que tiene un compuesto para inhibir un proceso oxidativo, la actividad antirradical representa la capacidad que tiene un compuesto para reaccionar con los radicales libres. La cafeína ha sido largamente investigada por su potencial actividad antioxidante ya que en la literatura se han reportado estudios evidenciando algunos efectos protectores principalmente guiados hacia su actividad recolectora de radicales $HO\bullet$, por lo que se supondría una actividad antirradical (Petrucci *et al.*, 2018).

Algunas investigaciones han apoyado la hipótesis de que la cafeína puede ser en parte responsable de los efectos antioxidantes descritos para el café (Varma *et al.*, 2010). En un estudio en el que se evaluó el efecto del consumo de café en la modulación de la capacidad antioxidante en el plasma, se demostró que la administración de cafeína pura induce inequívocamente cambios benéficos en

indicadores bioquímicos de EO tales como capacidad antioxidante total, glutatión total e hidroperóxidos lipídicos (Metro *et al.*, 2017).

Por otra parte, se ha sugerido que la cafeína y otras moléculas presentes en las semillas de café, o el café mismo, pueden actuar como un receptor de radicales libres, “capturando” a las especies reactivas que se generan durante el calentamiento de las semillas (Stefanello *et al.*, 2018). En estudios recientes se han mostrado efectos protectores sobre el ADN hasta después de las 2 h de haber ingerido café; aunque se ha propuesto que tales efectos pueden deberse a la combinación y/o concentración de otros compuestos bioactivos presentes en el café además de la cafeína, como puede ser el ácido clorogénico (Bakuradze *et al.*, 2016).

Las propiedades antioxidantes de la cafeína han sido demostradas por su capacidad de “secuestrar” radicales libres (León-Carmona & Galano, 2011); sin embargo, la mayoría de los estudios han reportado la capacidad antioxidantes de la cafeína en situaciones donde el EO es inducido, por lo que las condiciones en que se produce ese estrés pueden ser responsables de los diferentes efectos de la cafeína. Aunque los efectos protectores de la cafeína pueden relacionarse a su capacidad antioxidante, se necesitan más estudios para descifrar los mecanismos por los cuales la cafeína ejerce este efecto en la ausencia de agentes que promuevan el EO (Stefanello *et al.*, 2018).

5.9. Daño al ADN

Cuando varias ERO reaccionan con el ADN pueden generar diferentes tipos de daños por oxidación en las bases nitrogenadas. Estas lesiones incluyen purinas y pirimidinas dañadas, así como daño a proteínas de unión ADN monocatenario y sitios abásicos. La guanina es la base más susceptible a la oxidación (Barnes *et al.*, 2019).

La oxidación del genoma representa una ubicación crítica al daño por la oxidación bajo grandes cantidades de ERO puede conducir al desarrollo de cáncer, trastornos neurológicos y enfermedades cardiovasculares (Fleming &

Burrows, 2017). Las ERO son reconocidas como mediadores de daño celular a través de los radicales libres generados en la célula (Srinivas *et al.*, 2018), aunque también pueden inducir otras formas de daño al ADN (Srinivas *et al.*, 2018; Cadet & Wagner, 2013). El daño al ADN tiene un impacto directo en la fisiología de un individuo ya que puede alterar la habilidad de transcribir genes vitales (Gormally *et al.*, 2019).

Algunos estudios han demostrado que el daño y mutaciones en el ADN mitocondrial pueden jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad y el envejecimiento prematuro. Las mutaciones del ADN mitocondrial son particularmente perjudiciales para los tejidos con alta demanda de energía (incluyendo el cerebro, corazón, músculo esquelético, riñón y el sistema endocrino) y regularmente incrementan el riesgo de padecer cáncer y otro tipo de enfermedades en estos órganos (Finn *et al.*, 2012); sin embargo, aún no está claro si estas mutaciones son la causa de envejecimiento celular o simplemente se correlacionan (Lam & McKeague, 2019).

5.10. ADN y cafeína

Algunos estudios reportan que la cafeína por si sola o en combinación con agentes anticancerígenos, actúa en los puntos control del ciclo celular y previene su progresión (Tej & Nayak, 2018). Se ha reportado que la cafeína afecta la función del ciclo celular, induce la muerte celular programada (apoptosis) y perturba las proteínas reguladoras clave, incluyendo la proteína de supresión tumoral p53 (Bode & Dong, 2007). En algunos estudios se ha identificado que la cafeína potencia la letalidad inducida por drogas anticancerígenas permitiendo que la célula progrese a través de la fase G2 sin completar la reparación del ADN, y por lo tanto causando apoptosis (Kaplánek *et al.*, 2015).

En otros estudios se ha visto que los agentes causantes de daño al ADN arrestan la fase G2 del ciclo en células cancerígenas suprimiendo la actividad

de las cinasas dependientes de ciclina 1 (Cdk1), en este sentido la actividad de la cafeína se centra en evitar el arresto en la fase G2 inducida por estos agentes y guiar a la célula hacia la apoptosis. Este mecanismo indica que la cafeína tiene la capacidad de reactivar a las células cancerígenas mientras que en las células normales este efecto no es de gran impacto (Tej & Nayak, 2018; Tao *et al.*, 2017).

La cafeína ha sido usada experimentalmente en numerosos tipos de células bajo una variedad de condiciones y a concentraciones que van desde el rango de micromolar (μM) a un rango mayor de concentración y, debido a que la cafeína muestra efectos dependientes de la dosis, muchos de los datos recogidos respecto a sus efectos sobre el ciclo celular y la proliferación son ambiguos. (Bode & Dong, 2007).

5.11. La levadura como modelo de estudio

Tradicionalmente las levaduras han sido utilizadas como modelo para estudios sobre la respuesta de los puntos de control a diferentes agentes y condiciones y para el estudio de los mecanismos de reparación del ADN en células eucariotas (Finn *et al.*, 2012; Kocabey *et al.*, 2019).

Yarrowia lipolytica es una levadura dimórfica de bajo costo, usualmente aislada de productos lácteos o ricos en ácidos grasos (como queso o aceite de oliva). Es considerada una levadura de fácil manejo, no patógena probablemente porque no es capaz de crecer a más de 35°C (Pérez-Campo & Domínguez, 2001). Tiene un genoma completamente secuenciado y un creciente cuerpo de herramientas y protocolos experimentales que permiten su análisis. También es capaz de crecer rápidamente en una variedad de sustratos y tiene una excelente capacidad de acumulación de lípidos, comúnmente acumula más del 36% de su peso celular seco en forma de lípidos (Tai & Stephanopoulos, 2013). Sus condiciones óptimas de cultivo y crecimiento han sido previamente descritas (Barth & Gailardin, 1997; Liu *et al.*, 2015).

5.12. Estrés oxidativo en *Y. lipolytica*

Estudios previos han utilizado a *Yarrowia lipolytica* para el análisis de la producción de ERO, y la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante (Desentis, 2015; Miranda, 2016; Rodríguez, 2018)

Cuando las células de *Y. lipolytica* son cultivadas en medios con diferentes fuentes de carbono, se encontró que la glucosa genera una alta producción de ERO (Rodríguez, 2018). Por otro lado, se identificaron los genes que tienen mayor participación en la defensa antioxidante (*SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) (Desentis, 2015). Y al analizar su expresión en células sometidas a la presencia de agentes oxidantes, estos mostraron una respuesta rápida ya que aumentan su expresión durante los primeros 15 min de tratamiento, proceso que se revierte tras 60 min continuos de tratamiento con el mismo agente (Miranda, 2016).

5.13. Efecto de la cafeína en *Y. lipolytica*

En estudios en los que se han utilizado células de dos cepas mutantes de *Y. lipolytica* deficientes de los genes *RAD52* y *KU80*, involucrados en la reparación del ADN por HR y NHEJ, respectivamente, se observó un efecto citotóxico por parte de la cafeína, ya que mostró una disminución en el crecimiento de las células carentes de estos genes al ser tratadas con cafeína y/o con peróxido de hidrógeno como agente oxidante (Sifuentes, 2014; Quiñones-González *et al.*, 2019). En otro estudio realizado utilizando únicamente la cepa P01a de *Y. lipolytica* se encontró que el tratamiento con cafeína (5 mM) inhibió la expresión de los genes *RAD52* y *KU80* sugiriendo un mecanismo indirecto de daño al ADN por efecto de la cafeína (Castillo, 2020).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Material

6.1.1. Material químico

Los reactivos usados para el desarrollo de este proyecto fueron: extracto de levadura y agar (USBiological), peptona de caseína (MCD LAB), D-glucosa (BioBasic), cafeína (BioBasic), peróxido de hidrógeno (Jalmek), tris base (BioBasic), NaCl (Jalmek), tritón (BioBasic), SDS (ThermoScientific), fenol (Sigma), cloroformo (Jalmek), etanol puro grado biología molecular (Sigma), ISOLATEII RNA Mini kit (Bioline), EDTA (BioBasic), Go Script™ Reverse Transcription System Protocol (PROMEGA), MyTaq DNA polymerase, (Bioline), oligonucleótidos (Alpha DNA), agarosa (Bioline), bromuro de etidio (Biodiag), marcador de talla molecular Hyperladder IV (Bioline).

6.1.2. Material biológico

Para realizar el estudio se utilizó la cepa P01a de la levadura *Yarrowia lipolytica*.

6.2. Métodos

6.2.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio de tipo experimental, longitudinal y analítico. Para determinar el efecto de la cafeína sobre la expresión de genes de respuesta antioxidante se utilizaron cultivos en medio YPD adicionado con cafeína (5 mM) y cafeína (5 mM) + H₂O₂ (5 mM). Para el análisis entre los diferentes tratamientos se tomó como control negativo el cultivo en medio YPD sin adición de algún agente mientras que el control positivo de daño fue cultivado en medio YPD adicionado con H₂O₂ (5 mM).

El proceso experimental se realizó en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

6.2.2. Estrategia general

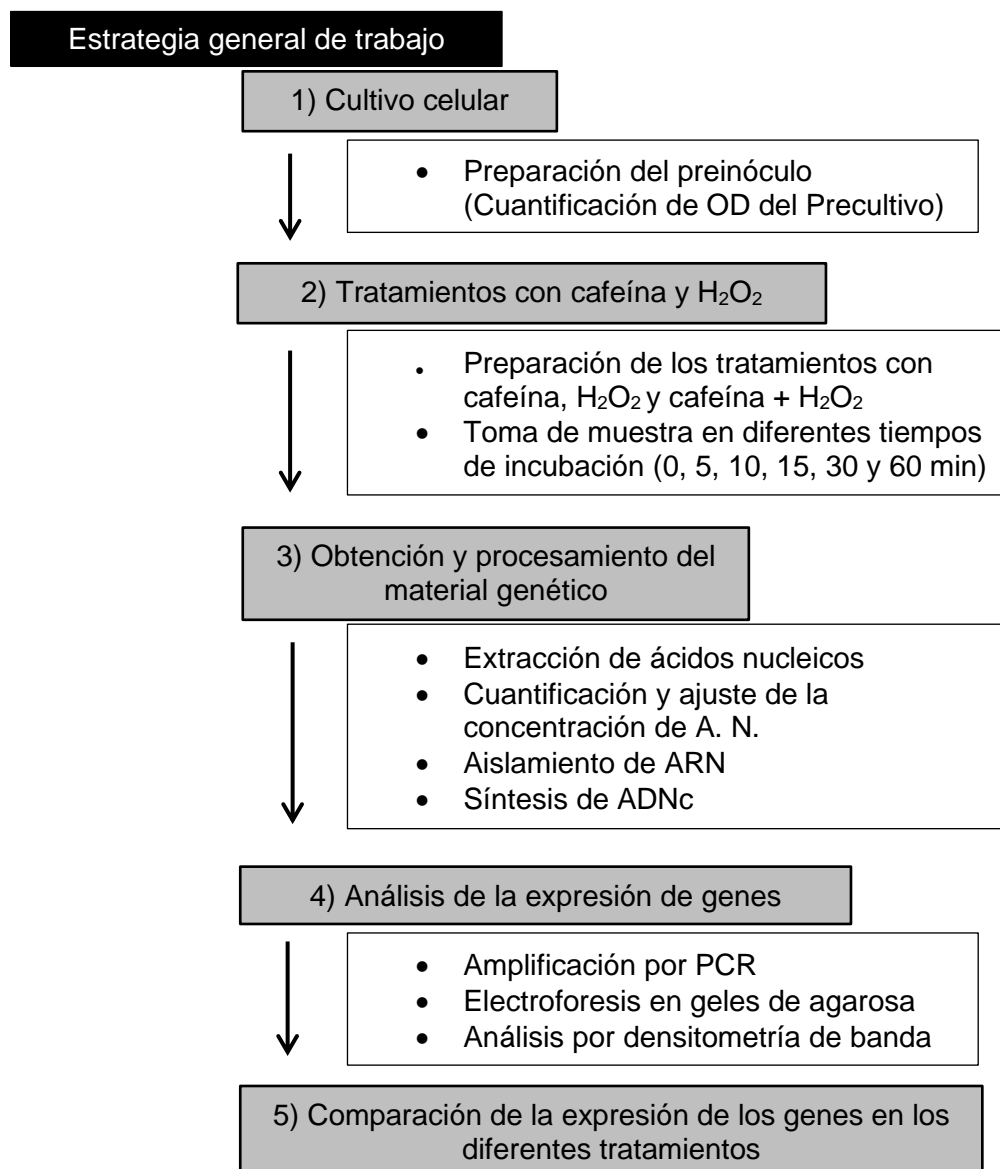


Figura 4. Estrategia general de trabajo.

6.3. Procedimiento experimental

6.3.1. Cultivo celular y tratamientos

6.3.1.1. Preparación de los medios de cultivo

Las células de la cepa P01a de *Y. lipolytica* se cultivaron en medio YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose) que consiste en 1% de extracto de levadura, 2% de peptona de caseína y 2% de glucosa. Se preparó medio de cultivo YPD para el preinóculo (50 ml) y los inóculos (400 ml). Para esto se disolvieron 0.5 g de extracto de levadura, 1 g de peptona de caseína y 1 g de glucosa en 50 ml de agua desionizada para el preinóculo y 4 g de extracto de levadura, 8 g de peptona de caseína y 8 g de glucosa en 400 ml de agua para los inóculos. Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave (121°C y 15 lb/pulg² de presión durante 15 min) y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

6.3.1.2. Preparación y ajuste del preinóculo según la OD

Para la preparación del preinóculo se partió de cultivos de las células de *Y. lipolytica* (Cepa P01a), en placas de Petri con medio YPD. Una colonia fue aislada e inoculada en un matraz Erlenmeyer (250 ml) con 50 ml de medio YPD, este proceso se realizó en condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar (SG 403, SterilGARD III Advance). Posteriormente, el preinóculo se incubó a 28°C con agitación (200 rpm) por 16 h en una incubadora (Lab Companion).

La cantidad de material biológico se estandarizó para los inóculos determinando la densidad óptica (OD) del preinóculo con el uso de un espectrofotómetro (UV-Visible Evolution 300, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 600 nm. Para determinar la OD inicial de los inóculos se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_i = (V_f)(C_f) \div (C_i)$$

En dónde:

- *Vi*: Volumen inicial
- *Cf*: Concentración final
- *Vf*: Volumen final
- *Ci*: Concentración inicial

6.3.1.3. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó adicionando el medio YPD previamente preparado con el volumen necesario de preinóculo para alcanzar una OD de 0.2, este proceso se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Se prepararon 4 matraces (1 para cada tratamiento) con la OD ajustada a 0.2, y se incubaron a 28°C y 200 rpm durante 16 h.

6.3.1.4. Tratamiento con cafeína

En condiciones de esterilidad se añadió la cantidad necesaria de cafeína para alcanzar una concentración de 5 mM en el medio de cultivo partiendo de una solución stock de 250 mM, esta concentración fue previamente establecida debido a que produce una disminución en el crecimiento de células de *Y. lipolytica* sin causar muerte celular (Sifuentes, 2014). Para determinar el volumen necesario se utilizó la siguiente fórmula:

$$Vi = (Vf)(Cf) \div (Ci)$$

El volumen determinado de cafeína se agregó a 2 matraces con inóculo, ambos contenían únicamente medio YPD.

6.3.1.5. Tratamiento con peróxido

En condiciones de esterilidad se añadió la cantidad necesaria de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para alcanzar una concentración de 5 mM en el medio de cultivo, esta concentración fue previamente establecida para inducir estrés

oxidativo (Sifuentes, 2014). Para determinar el volumen necesario se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_i = (V_f)(C_f) \div (C_i)$$

El volumen determinado de H₂O₂ se agregó a 2 matraces con inóculo, uno que contenía únicamente medio YPD y otro que contenía la cantidad de cafeína previamente determinada.

De esta manera se obtuvieron 4 tratamientos:

- A) YPD
- B) Cafeína [5 mM]
- C) Peróxido [5 mM]
- D) Cafeína [5 mM] + H₂O₂ [5 mM]

Los tratamientos fueron incubados a 28°C y 200 rpm. Una muestra de 5 ml fue tomada a los diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min) y recolectada en un tubo falcón adecuadamente etiquetado.

6.3.2. Obtención y procesamiento del material genético

6.3.2.1. Extracción de ácidos nucleicos

De las muestras de 5 ml obtenidas a diferentes tiempos (5, 10, 15, 30 y 60 min) se tomó una muestra de 1.5 ml y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min utilizando una microcentrífuga (Eppendorf) con la finalidad de concentrar el paquete celular en el fondo de tubo y eliminar el sobrenadante. Este paso se repitió 3 veces por lo que se usaron 4.5 ml de cultivo para obtener el paquete celular.

Partiendo de los paquetes celulares se realizó la extracción de ácidos nucleicos (AN) por el método de Hoffman y Winston (1987) a una temperatura de 4°C en cama de hielo molido. Este método consiste en el fraccionamiento de la pared celular por un medio mecánico añadiendo 0.3 g de perlas de vidrio (0.2 mm de

diámetro), y un medio químico utilizando 400 µl de buffer de lisis (Tritón 100X, SDS 1%, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Tris Base 10 mM). Las muestras se agitaron en vórtex durante 10 seg para la disolución del paquete celular en el buffer. Posteriormente, se agregaron 400 µl de fenol-cloroformo 50:50 para separar la fase acuosa que contiene los AN, la muestra se agitó en vórtex en 3 periodos (1 min en agitación/ 1 min en hielo) y posteriormente se centrifugando a 12000 rpm durante 10 min para aislar la fase acuosa (400 µl) y transferirla a un tubo nuevo. Se agregaron 0.1 volúmenes (40 µl) de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes (800 µl) de etanol al 100% frío para precipitar los AN. Las muestras se mezclaron por inversión 3 veces y se incubaron a -20°C durante 20 min. Posterior a la incubación se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante por decantación. El pellet de AN se lavó con 500 µl de etanol (70%) y se centrifugó por 5 min a 12000 rpm, el sobrenadante se eliminó por decantación, esta operación se realizó 2 veces. Los restos de etanol se eliminaron con micropipeta y se dejaron secando a temperatura ambiente (TA) durante 10 min. Los AN obtenidos se resuspendieron con 50 µl de agua estéril (PISA®) y se almacenaron perfectamente etiquetados a una temperatura de -80°C hasta su uso.

6.3.2.2. Cuantificación y ajuste de la concentración de ácidos nucleicos

Los AN obtenidos se cuantificaron utilizando el equipo NanoDrop 2000 UV-Visible (Thermo Scientific) a una OD de 260 nm. La OD se ajustó a 1000 ng/µl de ADN realizando diluciones con agua estéril (PISA®).

6.3.2.3. Obtención del ARNm

Después de la obtención de los AN se aisló el ARN utilizando la enzima DNasa I ISOLATE II RNA Mini kit (Bioline). Para ello, se tomaron; 1000 ng de ADN en 8 µl de muestra (ajustando está concentración con agua estéril (PISA®), 1 µl de enzima DNasa y 1 µl de buffer de reacción para DNasa, los elementos se

mezclaron en un tubo de polipropileno de 200 μ l de capacidad. Las muestras se incubaron a una temperatura de 37°C durante 1 h en un termociclador (PCR Sprint Thermal Cycler®; Thermo Electron Corporation). Una vez terminado este periodo de incubación se agregó a la muestra 1 μ l de enzima DNasa y se incubó nuevamente a 37°C por 1 h. Posterior a los dos periodos de incubación con la enzima se agregó 1 μ l de EDTA (25 mM) para inactivar a la enzima y se incubó a 65°C por 10 min. El ARN aislado se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop 2000. En la tabla 2 se muestran los componentes de la reacción para el tratamiento con DNasa.

Tabla 1. Componentes de la reacción con la enzima DNasa

Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración
AN	8	1000 ng
Enzima DNasa	2	-
Buffer RDN	1	10X
EDTA	1	25 mM
Volumen final =	12	

6.3.2.4. Síntesis de ADNc

A partir del ARN obtenido se sintetizó el ADN complementario (ADNc) utilizando el kit Go Script™ Reverse Transcription System Protocol (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo consiste en 2 reacciones, cada una con diferentes periodos de incubación, la mezcla de los reactivos necesarios para cada reacción se realizó a una temperatura de 4°C en tubos de polipropileno de 200 μ l de capacidad. Los componentes de cada reacción se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Componentes de las reacciones con la enzima RT

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración
Reacción 1		
ARN	8	500 ng
Oligo dT	1	0.5 µg
H ₂ O	3	-
Volumen =	12	-
Reacción 2		
Buffer	4	5 X
MgCl ₂	2	25 mM
dNTP's	1	0.5 mM
Enzima RT	1	-
Volumen =	8	-
Volumen final =	20	-

Una vez mezclados los componentes de la reacción 1 esta se incubó a la temperatura correspondiente (70°C) en un termociclador (Thermo Scientific Fisher) y posteriormente se mantuvo en hielo molido (4°C) durante 5 min. Durante este tiempo se mezclaron en otro tubo los componentes de la reacción 2 y se transfirieron al tubo de la reacción 1 el cual nuevamente se incubó a la temperatura correspondiente. Las temperaturas de incubación de cada reacción se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de RT

Reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	70	5
Hielo	4	5
2	25	5
	42	60
	70	15
Conservación	4	∞

El ADNc obtenido se cuantificó y se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su uso.

6.3.3. Análisis de la expresión de genes por RT-PCR

6.3.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis de la expresión de genes se realizó por PCR (Polymerase Chain Reaction) semicuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia correspondiente a los genes: *SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* y el gen constitutivo *ACT*. El ADNc se utilizó para la reacción de PCR en conjunto con los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción. La mezcla de los componentes se realizó en un tubo de polipropileno de 200 µl de capacidad a una temperatura de 4°C utilizando un cama de hielo molido. Los tubos fueron previamente etiquetados de acuerdo con los oligonucleótidos (forward y reverse) específicos para cada gen y con la muestra correspondiente. Los componentes de la reacción se muestran en la tabla 4 mientras que las condiciones de temperatura se muestran en la tabla 5. Los periodos de incubación se realizaron en un termociclador (Thermo Scientific Fisher).

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR

Reactivos	Volumen (µl)
H₂O	4.4
Buffer 5X	2.5
Oligonucleótido (F)	2
Oligonucleótido (R)	2
Taq polimerasa	0.1
ADNc	1.5
Volumen final =	12.5

Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR

Etapa	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
1	Desnaturalización	95	5	1
2	Desnaturalización		72	1
	Alineamiento			
	Extensión			
3	Extensión final		10	1
4	Conservación	4	∞	-

6.3.3.2. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. La agarosa se calentó para su adecuada disolución utilizando una placa de calentamiento (PC420D, Corning Stirrer). Una vez disuelta la solución se transfirieron 25 ml que se transfirieron a un tubo de polipropileno de fondo cónico y se le agregaron 2 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), la mezcla se homogeneizó por inversión y se vertió en un molde con un peine de plástico para la formación de pocillos. Se dejó gelificar por 35 min y posteriormente en cada pocillo se cargaron 10 µl de producto de PCR mezclados con 2 µl de buffer de carga (0.25% azul de bromofenol y 40% de sucrosa). Para verificar que los genes amplificados correspondieran al tamaño del fragmento analizado se cargaron en el primer pocillo 2 µl de marcador de talla molecular (Hyperladder IV, Bionline) y 2 µl de buffer de carga. El gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y se le agregó Buffer TAE 1X. Para la separación de bandas se aplicó una corriente eléctrica de 20 Volts durante 5 min y 80 Volts durante 60 min con una fuente de poder Power pack 300 (Bio Rad).

6.3.3.3. Obtención de los valores de expresión por densitometría de banda

Cada gel se visualizó con luz UV en un fotodocumentador (Gel Doc-It Imaging System). Los valores de expresión correspondientes a cada gen se obtuvieron por medio del software Vision Works (UV-Visible Evolution 300, Thermo Scientific), en cada uno de los experimentos estos valores se ajustaron con respecto a la expresión del gen constitutivo *ACT*.

6.3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS V.22 (IBM, Inc. Chicago Illinois, USA). Se aplicaron pruebas de normalidad y posteriormente pruebas paramétricas para comparación de medias (ANOVA). Para comparar los niveles de expresión de cada gen se consideró un intervalo de confianza del 95%.

7. RESULTADOS

7.1. Estandarización de las condiciones de PCR

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se demostró que el gen de actina (*ACT*) puede ser utilizado como gen constitutivo para el análisis de expresión de genes en *Y. lipolytica* (Miranda, 2016). Por lo que, en este trabajo, se incluyó el gen de *ACT* para la normalización de los datos obtenidos en los diferentes experimentos de expresión.

Las características de los oligonucleótidos utilizados (secuencia, tamaño del fragmento que amplifican y temperatura de alineamiento que se utilizó para el análisis en el presente trabajo) se muestran en la tabla 6.

La temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos específicos utilizados para el análisis fue de 60° C para todos los genes. Esta temperatura de alineamiento se determinó en otros estudios realizados en nuestro laboratorio en dónde se analizaron estos genes (Desentis, 2015; Miranda, 2016; Quiñones, 2018; Villarreal, 2020).

Tabla 6. Características de los oligonucleótidos utilizados para la PCR.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'→3')	Amplicón (pb)	Temperatura (°C)
<i>SOD1</i>	F: CACTGGAACCTTCTGCTCCGTC	547	60
	R: CTGGACGTCCTTTTCGCTCCTCC		
<i>SOD2</i>	F: CTTGAGAGAGATTCCAAGGTCTCC	390	60
	R: CTTGAGAGAGATCGGCATGGCC		
<i>GPX</i>	F: CCGCTTTCTACAACCTCGCTCC	411	60
	R: CGACGTTACCGTGCTTATCAACC		
<i>CAT1</i>	F: CCACCACCGTGCGATTTTCTACC	539	60
	R: CATGGTCTGAAGGGAAACGGTCC		
<i>CAT2</i>	F: CCATGCAAAGGGAGGAGGAGCC	623	60
	R: CCGTCCACGAGGGGTAATCCC		

<i>CAT3</i>	F: CAAGACCTTCACTCGATTCTCCACC	425	60
	R: CGTCATTGGTGAGGTTCTTGATGCC		
<i>ACT</i>	F: GGTATCGTTCTTGACTGGTGATGG	692	60
	R: GGCCTCGTCGTACTIONCCTGCTTGG		

En la figura 5 se muestran los productos de PCR obtenidos al amplificar ADN genómico utilizando estos oligonucleótidos con la finalidad de corroborar su especificidad y eficiencia. El tamaño de cada una de las bandas corresponde al fragmento esperado, para la amplificación con cada uno de los pares de oligonucleótidos utilizados.

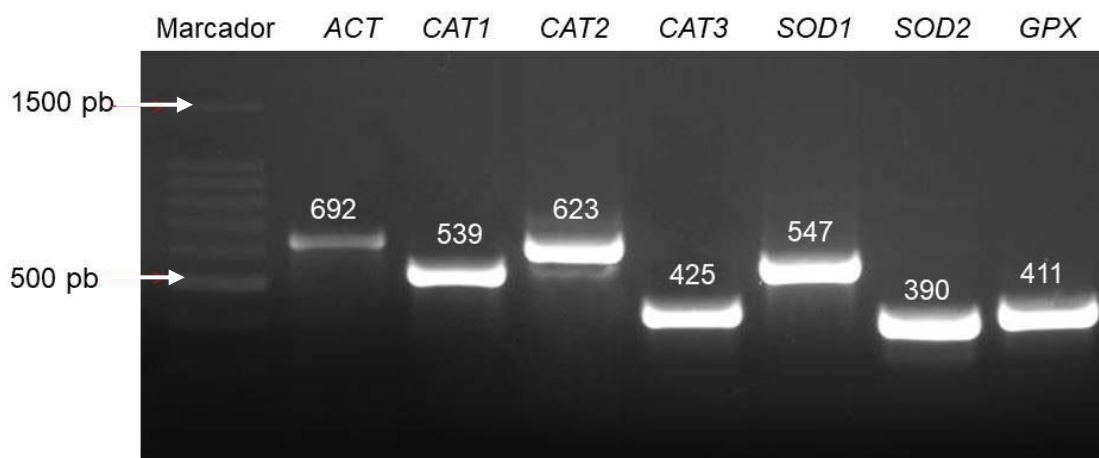


Figura 5. PCR de los genes *ACT*, *SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* amplificados en ADN.

Productos de PCR visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se indica el tamaño de las bandas que corresponde a cada gen de acuerdo con el marcador de talla molecular (1500 pb, Promega); Gen *ACT* (692 pb); *CAT1* (539 pb); *CAT2* (623 pb); *CAT3* (425 pb); *SOD1* (547 pb); *SOD2* (390 pb); *GPX* (411 pb) pb: pares de bases correspondientes al marcador.

7.2. Aislamiento de ARN

Una vez eliminado el ADN de las muestras con la enzima DNasa I, el ARN aislado fue sometido a PCR con oligonucleótidos específicos para el gen *ACT* con la finalidad de determinar la efectividad del tratamiento con la enzima DNasa. En la figura 6 se observa que en la muestra tratada con la enzima DNasa no se obtuvo producto amplificado lo cual indica que el ADN genómico fue eliminado por completo con el tratamiento utilizado.

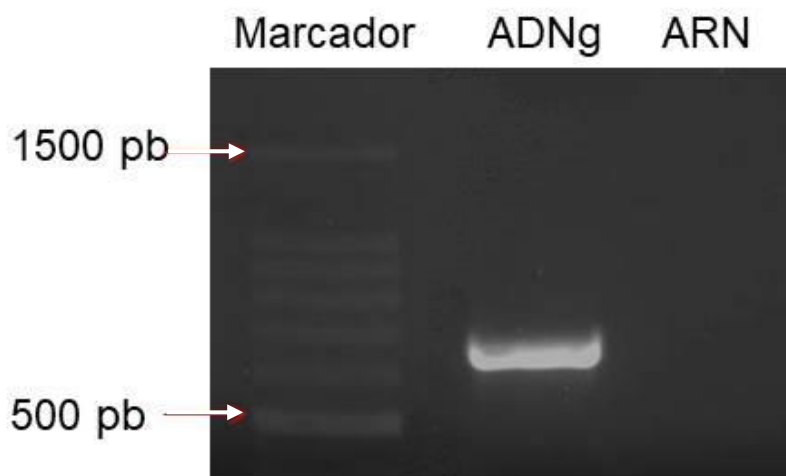


Figura 6. Comprobación de la efectividad del tratamiento con DNasa.
Electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las muestras tratadas con DNasa se sometieron a PCR para verificar la eliminación total del ADN genómico. Carril 1: Marcador de talla molecular 100 - 1500 pb (Promega); Carril 2: ADN genómico; Carril 2: ARN obtenido del tratamiento con DNasa. pb: pares de bases correspondientes al gen marcador.

7.3. Obtención de ADN complementario (ADNc)

Para la obtención del ADNc se utilizaron 500 ng de ARN obtenido a partir del tratamiento con la enzima DNasa. En el apartado de material y métodos se describe el proceso de obtención de ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa, como resultado del proceso se obtuvieron concentraciones de aproximadamente 700 a 800 ng/ μ l de ADNc los cuales se ajustaron a una concentración de 500 ng/ μ l; de los que se utilizaron 2 μ l (1000 ng) para la reacción de PCR.

7.4. Análisis de la expresión de genes de respuesta antioxidante

El ADNc obtenido a partir del ARN mensajero correspondiente a las células de *Y. lipolytica* tratadas con los distintos agentes durante diferentes tiempos se utilizó para amplificar los fragmentos de los genes de interés (*SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) mediante PCR. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se analizaron por densitometría para determinar la intensidad en pixeles de cada banda. Como se

indicó, los valores obtenidos por densitometría correspondientes a la banda del gen *ACT* se utilizaron para normalizar el valor obtenido de los genes analizados en cada experimento y determinar el patrón de expresión de cada uno de ellos en cada tratamiento. La comparación del nivel de expresión de cada gen se realizó con el valor correspondiente al promedio y la desviación estándar obtenidos a partir de 3 experimentos independientes.

7.4.1. Análisis de la expresión de genes en respuesta al tratamiento con cafeína

Los posibles cambios en la expresión de los distintos genes se determinaron con respecto al gen constitutivo (*ACT*) en las células cultivadas en medio YPD sin tratamiento. En la figura 7 se observan los patrones de expresión de los genes analizados a diferentes tiempos de incubación con cafeína (5 mM). El promedio y la desviación estándar se calcularon a partir de los valores de expresión de 3 experimentos independientes, a partir de estos se hicieron las gráficas que permiten observar las variaciones en la actividad transcripcional de los distintos genes.

En las células tratadas con cafeína se observó un aumento en la expresión del gen *SOD1* a los 30 y 60 min de incubación, mientras que con el gen *SOD2* la expresión aumentó abruptamente a partir de los 5 min y alcanzó los mayores niveles a los 30 y 60 min. Un patrón similar se observó como resultado de la transcripción del gen *GPX* el cuál mostró un aumento gradual en su expresión a partir de los 5 min, y alcanzando su nivel máximo de expresión a los 30 min de incubación. Con respecto a los genes que codifican para catalasas se observó que, el gen *CAT1* mostró un aumento a partir de los 5 min; a los 10 min de tratamiento mostró su mayor nivel de expresión y éste comenzó a disminuir a partir de los 15 min hasta alcanzar valores basales a los 60 min. En el gen *CAT2* el aumento en la actividad transcripcional se observó a partir de los 10 min de incubación de las células en medio con cafeína; el mayor aumento en los niveles de expresión se observó a los 15 min y posteriormente (a 30 y 60

min) se presentó la disminución de la expresión, sin que estos valores llegaran a los observados en las células sin tratamiento con cafeína (0 min). El gen *CAT3* mostró un patrón de expresión similar a la del gen *CAT2*, aunque el aumento en la expresión de *CAT3* inició a partir de los 5 min de incubación con cafeína; el nivel máximo de expresión se alcanzó a los 15 min y a los 30 y 60 min, se observó una disminución en los valores de expresión.

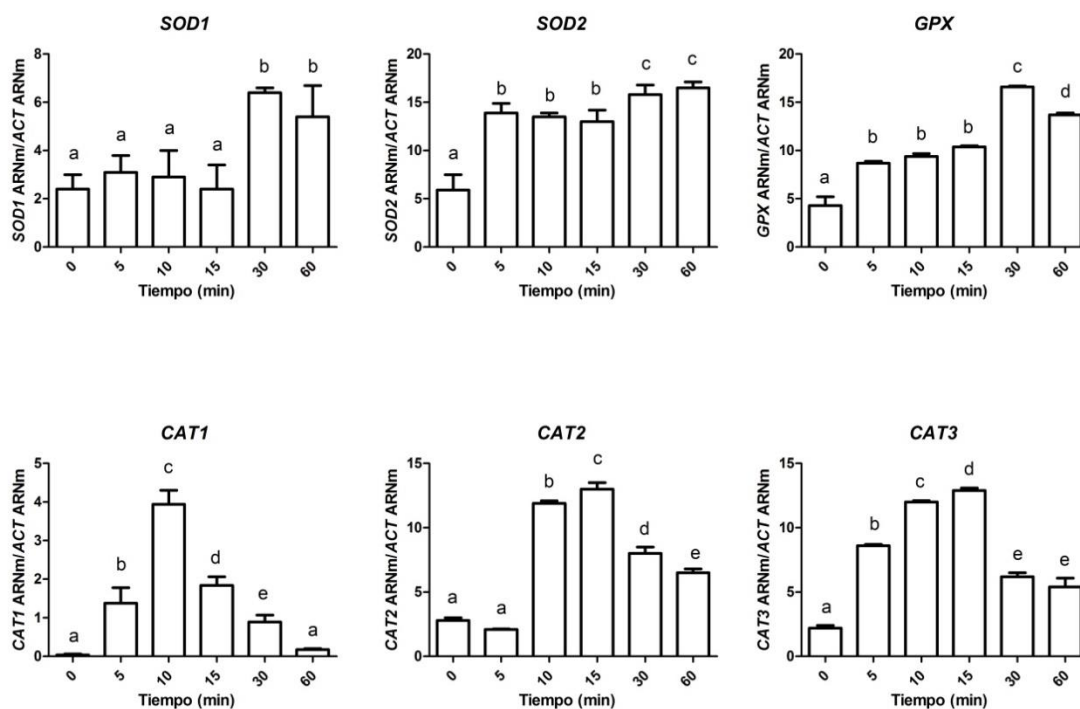


Figura 7. Expresión de los genes *SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* en células de *Y. lipolytica* tratadas con cafeína (5 mM) durante diferentes tiempos.

El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de tres experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos comparados mediante ANOVA y post hoc de Games-Howell (*GPX*, *CAT1* y *CAT3*) o Tukey (*SOD1*, *SOD2* y *CAT2*).

En general, se observó que cada uno de los genes que participan en la respuesta antioxidante de *Y. lipolytica* presenta un patrón de expresión temporal específico, en respuesta al tratamiento con cafeína (5 mM). La mayor similitud observada entre estos patrones de expresión es la correspondiente a los genes que codifican para catalasas, observándose un nivel máximo a los 10-15 min, y posteriormente una disminución de la expresión (15 min en *CAT1*, 30 y 60 min

en los genes *CAT2* y *CAT3*). Los patrones de expresión temporal de los genes *CAT2* y *CAT3*, presentan la mayor similitud.

7.4.2. Análisis de la expresión de genes en respuesta al tratamiento con H₂O₂.

De igual forma que con las muestras tratadas con cafeína se determinó la actividad transcripcional de los distintos genes en las muestras tratadas con H₂O₂, con respecto al gen constitutivo (*ACT*) en células sin tratamiento. En la figura 8 se observa el patrón de expresión de cada gen en las células tratadas con H₂O₂, (5 mM). Los valores que se utilizaron para la elaboración de las gráficas corresponden al promedio y la desviación estándar calculados a partir de los valores de expresión de tres experimentos independientes.

En las células tratadas con H₂O₂ se observó que los genes que codifican para superóxido dismutasa (*SOD1* y *SOD2*) muestran un aumento a partir de los 10, 15 y 30 min de tratamiento mientras que a los 60 min hay una recuperación de la expresión basal (0 min). El gen *GPX* mostró un aumento en la expresión a los 5 min; posteriormente alcanzó sus valores máximos a los 10 min y se mantuvieron hasta los 30 min; a los 60 min el nivel de expresión disminuyó sin llegar al nivel basal. En los genes de catalasa se observó que el gen *CAT1* aumento a los 15 y 30 min de tratamiento y recuperó su expresión basal a los 60 min; el gen *CAT2* mostró un aumento en su expresión a los 5 min mientras que a los 30 min se observó el mayor nivel de expresión el cuál disminuyó a los 60 min; el gen *CAT3* únicamente mostró cambios significativos al min 60 de tratamiento en donde se encontró una menor expresión del gen.

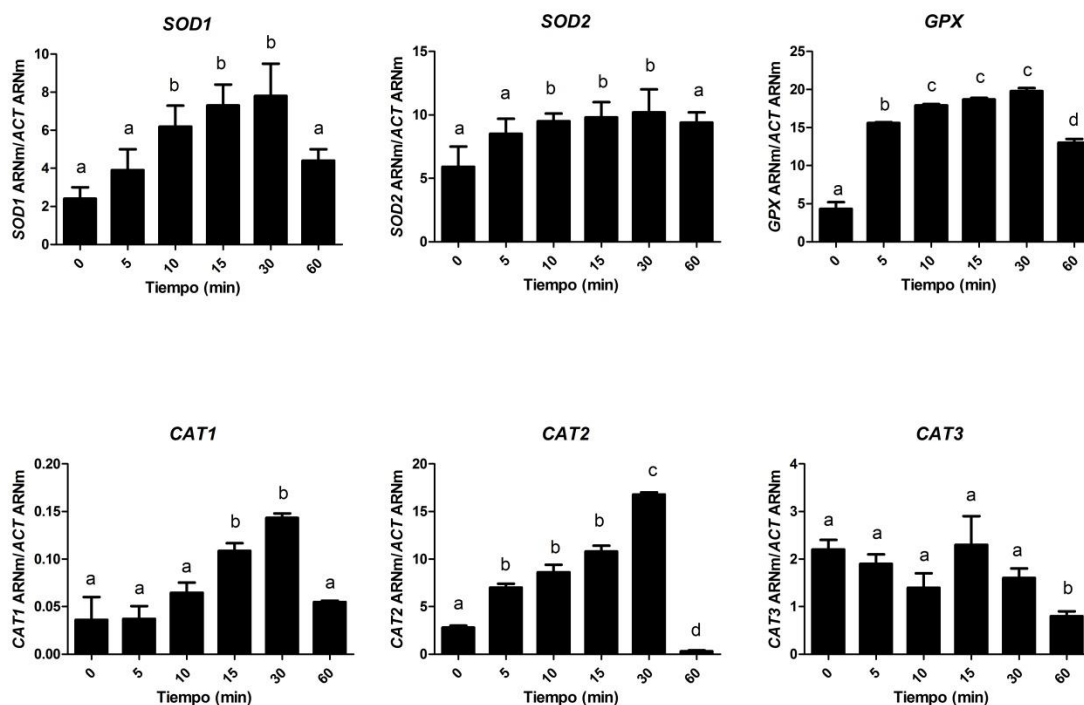


Figura 8. Expresión de los genes *SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* en células de *Y. lipolytica* tratadas con H_2O_2 durante diferentes tiempos.

El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de tres experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos comparados mediante ANOVA y post hoc de Games-Howell (*GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*) o Tukey (*SOD1* y *SOD2*).

7.4.3. Análisis de la expresión de genes en respuesta al tratamiento con cafeína y H_2O_2 .

En las células tratadas con la mezcla de cafeína y H_2O_2 (ambas con concentración de 5 mM), de manera similar a los tratamientos con los agentes de forma aislada, se determinaron los cambios en la expresión de los distintos genes con respecto al gen constitutivo (*ACT*) en las células sin tratamiento. En la figura 9 se observa el patrón de expresión de los genes analizados. Las variaciones en la actividad transcripcional de los distintos genes se determinaron comparando los valores promedio y la desviación estándar obtenidos de tres experimentos independientes.

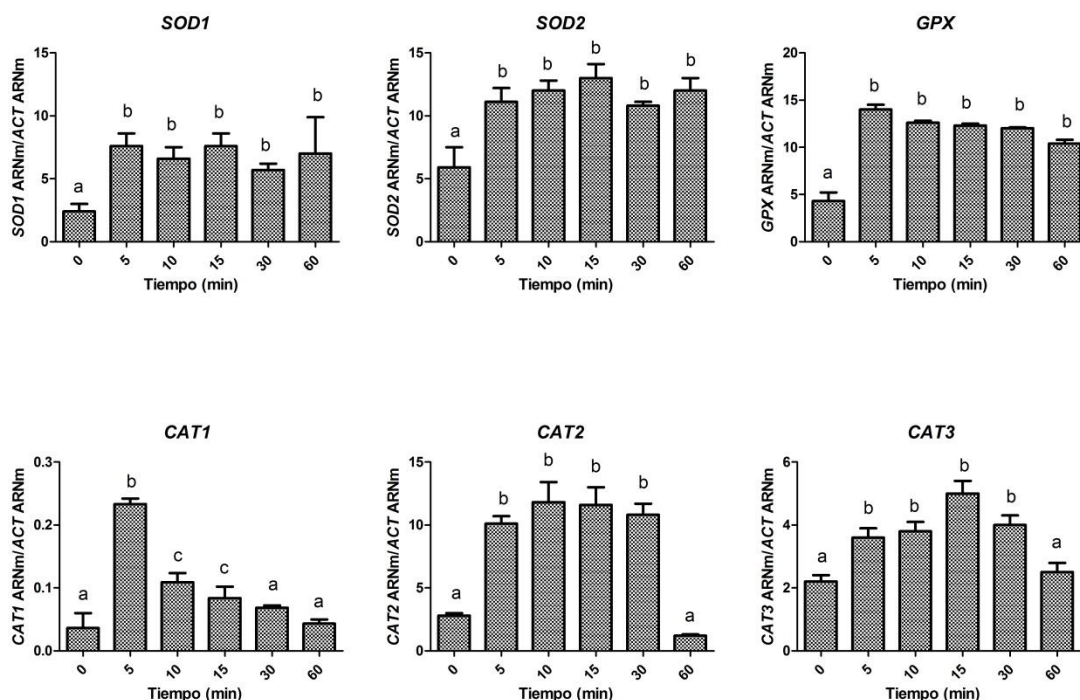


Figura 9. Expresión de los genes *SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* en células de *Y. lipolytica* tratadas con cafeína y H_2O_2 durante diferentes tiempos.

El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de tres experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos comparados mediante ANOVA y post hoc de Games-Howell (*GPX*, *CAT1* y *CAT3*) o Tukey (*SOD1*, *SOD2* y *CAT2*).

En los resultados obtenidos se observa que los genes *SOD1*, *SOD2* y *GPX* aumentaron su nivel de expresión partir de los 5 min sin mostrar una recuperación de la expresión basal. En los genes que codifican para catalasas, el gen *CAT1* mostró un aumento en su nivel de expresión a los 5 min de incubación, el nivel de expresión disminuyó a los 10 min y recuperó su expresión basal a los 30 min; los genes *CAT2* y *CAT3* mostraron un aumento en su expresión a partir de los 5 min y una recuperación a su estado basal a los 60 min.

Dado que se encontró que todos los genes mostraron diferencias significativas entre los 15 y 30 min de incubación con cada agente, se realizaron gráficas que muestran los resultados obtenidos a partir de las muestras al minuto 15 de incubación. Los valores de *p* se obtuvieron a partir de la prueba de ANOVA al comparar los resultados obtenidos de cada tratamiento (Ver Anexos).

7.4.4. Análisis de la expresión de genes a los 15 min de incubación con los diferentes tratamientos.

Al analizar los cambios en la respuesta transcripcional de los genes que codifican para la enzima superóxido dismutasa observamos que el gen *SOD2* presenta una mayor expresión en comparación con el gen *SOD1*, en todos los tratamientos. Al hacer la comparación de los resultados obtenidos con el gen *SOD1*, se observa que únicamente las muestras tratadas con H_2O_2 y cafeína + H_2O_2 mostraron diferencias al compararlas con las muestras sin tratamiento. En cuanto al gen *SOD2*, observamos un incremento significativo en la expresión del gen, con respecto al grupo control, cuando las células fueron sometidas a los 3 tratamientos (figura 10).

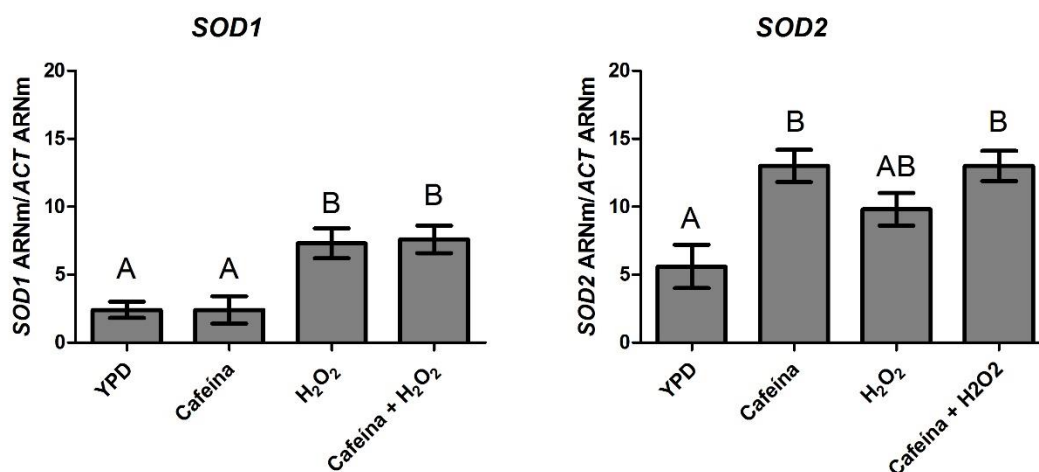


Figura 10. Expresión de los genes *SOD1* y *SOD2* a los 15 min de incubación con cada tratamiento. El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de tres experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos comparados mediante ANOVA

Con respecto a la actividad transcripcional del gen *GPX*, se observó que a los 15 min de incubación en todos los tratamientos la expresión aumentó significativamente con respecto al tratamiento control (figura 11). En las muestras tratadas con cafeína sola o en combinación con H_2O_2 los valores de expresión son similares ($p = 0.141$) entre ellas, mayores al grupo control y significativamente menores que la expresión gen *GPX* observada bajo el tratamiento de las células con H_2O_2 solo ($p = 0.000$).

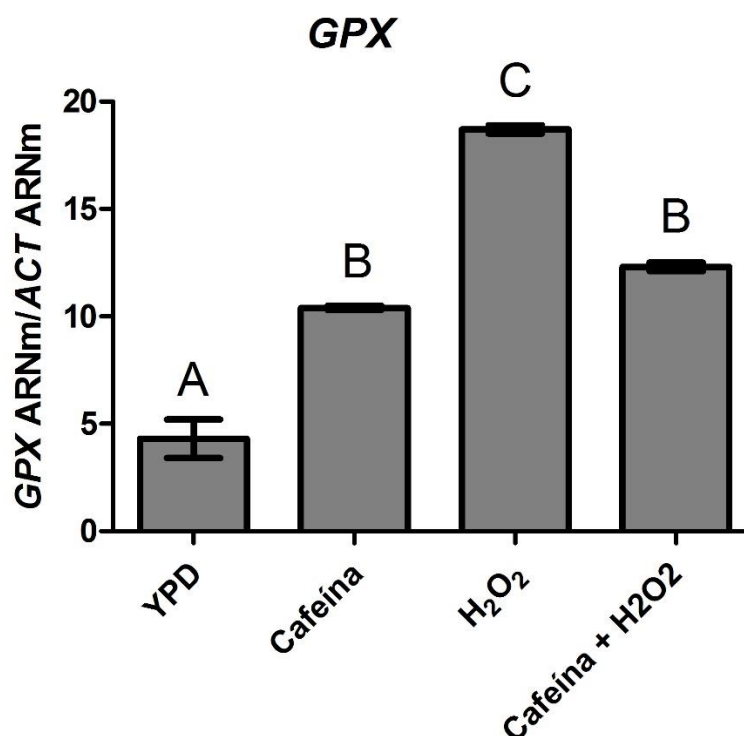


Figura 11. Expresión del gen *GPX* a los 15 min de incubación con cada tratamiento.

El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de tres experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos comparados mediante ANOVA

En el análisis de los genes que codifican para la enzima catalasa: *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* (figura 12), se observó que el gen *CAT1* mostró una menor respuesta transcripcional en todos los tratamientos probados, en comparación con los genes *CAT2* y *CAT3*. La expresión de *CAT1* solo fue significativamente mayor en las muestras obtenidas de las células tratadas con cafeína. Con respecto al gen *CAT2*, a los 15 min de incubación en todos los tratamientos se observó una respuesta transcripcional significativamente mayor, con respecto al grupo control. Además, se observó que el mayor nivel de expresión de obtuvo en las células tratadas con cafeína sola o en combinación. Al analizar los resultados de la expresión del gen *CAT 3*, se observó que las muestras tratadas solo con cafeína (5 mM) muestran el mayor nivel de expresión (aproximadamente 6 veces mayor) a los 15 min; en las muestras tratadas con cafeína + H₂O₂

también se incrementó la expresión (aproximadamente 3 veces) mientras que en presencia de H₂O₂ solo (5 mM) no se observaron cambios significativos en la expresión del gen *CAT3* (figura 12).

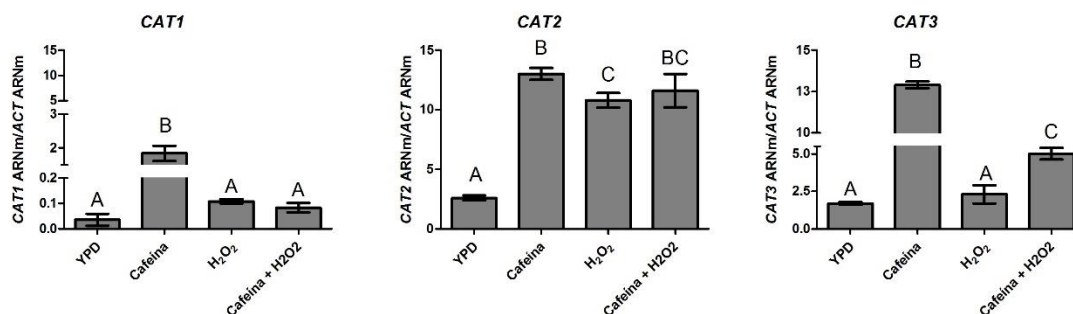


Figura 12. Expresión de los genes *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* a los 15 min de incubación con cada tratamiento.

El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de tres experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre los tiempos comparados mediante ANOVA

8. DISCUSIÓN

El café es, después del agua, la bebida más comercializada y consumida a nivel mundial por lo que se han realizado diversos estudios con la finalidad de conocer sus efectos sobre el organismo, especialmente el papel que juega la cafeína, ya que es uno de los componentes más importantes presentes en el café (Jeon *et al.*, 2019). Aunque convencionalmente a la cafeína se le atribuyen los efectos fisiológicos del café, la realidad es que esto no es completamente cierto, un ejemplo de ello es la actividad antioxidante atribuida a la capacidad de captar radicales libres y de donar electrones que ha sido descrita en estudios en donde se analiza el efecto del café por lo que estos efectos no necesariamente pueden ser atribuidos a la cafeína por si sola sino al efecto de algunos otros componentes del café como el ácido clorogénico o el ácido cafeico (Muhammed *et al.*, 2021).

El café es una mezcla compleja de compuestos bioactivos que se pueden encontrar en los granos de forma natural, o se pueden generar durante el proceso de tostado. Algunos de ellos son considerados antioxidantes principales que actúan como captadores de radicales libres e inductores de la respuesta antioxidante en conjunto con la cafeína (Sjakste *et al.*, 2020). Por su parte, la cafeína (1, 3, 7 - trimetilxantina) es una xantina alcaloide que se encuentra en una gran variedad de productos que forman parte de la dieta (Xu *et al.*, 2020). Se ha comprobado que su ingesta diaria en dosis moderadas es capaz de producir efectos positivos sobre el SNC (Li *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2020). A pesar de sus efectos benéficos, el consumo de cafeína también ha sido asociado con efectos negativos como pérdida de hueso, reducción de la densidad ósea, incremento de riesgos en el embarazo, cambios en el comportamiento y privación del sueño (Georgalas *et al.*, 2021), aunque es necesario mencionar que se ha elucidado que estos efectos están determinados por la dosis ingerida y que dependerán además del género y la edad de la persona que la consume (Li *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2020). En épocas recientes, el impacto de la cafeína como antioxidante ha estado, de

igual forma, determinado por reportes que indican un efecto antioxidante o prooxidante dependiente de la dosis administrada. En estudios recientes se ha encontrado que dosis bajas de cafeína no muestran un aumento significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) ni modificaciones en la actividad de enzimas responsables de la respuesta antioxidante como catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa; contrario a lo que sucede al utilizar dosis mayores. Como se mencionó, ambos efectos, benéficos o perjudiciales, son posibles y su efecto sobre el estrés oxidativo depende de la dosis de cafeína ingerida (Onaolapo, 2020).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son subproductos del metabolismo aeróbico con un efecto dual ya que, a pesar de ser esenciales para el organismo, también pueden tener efectos perjudiciales sobre las macromoléculas celulares. Niveles bajos de ERO funcionan como moléculas de señalización, mientras que un aumento en los niveles de ERO puede provocar oxidación y mutaciones que alteran la estructura de diferentes biomoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y a su vez la función celular normal, es decir, el efecto de las ERO sobre la célula dependerá de su concentración intracelular. Para asegurar el balance entre la producción y captación de las ERO es necesario un sistema de defensa antioxidante compuesto por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que tienen como función neutralizar la producción de ERO y de esta forma evitar el estrés oxidativo (Li *et al.*, 2019; Tuy *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) constituyen un sistema de defensa antioxidante de primera línea que juega un papel clave y fundamental en los mecanismos y estrategias de defensa total de los sistemas biológicos por lo que, los estudios en los que se busca evaluar el estrés oxidativo se enfocan en analizar su actividad enzimática (Ighodaro & Akinloye, 2018; Muñoz-Peñuela, 2021).

La levadura *Yarrowia lipolytica* ha sido utilizada como modelo de estudio de diversos procesos biológicos ya que confiere beneficios en cuanto a la facilidad

de manipulación como organismo modelo y el bajo costo que representa su cultivo (Patterson *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Ouphanit *et al.*, 2019). Utilizando a *Y. lipolytica*, como modelo de estudio en trabajos previos en nuestro laboratorio se ha encontrado que la cafeína, a una concentración de 5 mM, tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células sin causar muerte (Sifuentes, 2014) lo que sugiere un posible efecto genotóxico derivado del daño citotóxico provocado por la cafeína (Quiñones-González *et al.*, 2019). Sin embargo, al analizar la expresión de los genes *RAD52* y *KU80* (implicados en los mecanismos de reparación del daño al ADN) en células tratadas con cafeína [5 mM] se encontró que la cafeína inhibió la actividad de estos genes (*RAD52* y *KU80*); sin embargo, también se observó un aumento en la expresión del gen *CAT3*, resultados que sugieren que la cafeína ejerce su efecto de daño a las células mediante un mecanismo indirecto de daño al ADN, que posiblemente involucra la generación de ERO y por consecuencia estrés oxidativo (Castillo, 2020).

En el presente trabajo, con el objetivo de analizar el posible efecto indirecto de daño al ADN se utilizó la cepa P01a de *Yarrowia lipolytica* para determinar el patrón de expresión de los genes involucrados en la respuesta celular antioxidante (*SOD1*, *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3*), mismos que ya se han analizado en nuestro laboratorio (Desentis, 2015; Miranda, 2016; Villarreal, 2020). Determinar el patrón de expresión de estos genes permite establecer los puntos en los que el tratamiento genera una mayor respuesta. Un tiempo de respuesta corto implica que la célula pasara de la transcripción a la traducción de estos genes en la primera hora de tratamiento por tanto las reacciones enzimáticas que responden a los efectos provocados por el agente podrán llevarse a cabo mientras la célula se adapta al ambiente que contiene el agente estudiado.

Con la intención de comparar los resultados mostrados en el tratamiento con cafeína (5 M) se analizó también la actividad transcripcional de estos genes en un tratamiento con un agente oxidativo conocido (H_2O_2 , 5 mM) y la combinación

de ambos agentes, cada uno con la concentración 5 mM. El punto de partida para este trabajo fue nuestra hipótesis en la que planteamos que la cafeína induce el aumento en la expresión de genes de respuesta antioxidante en células de *Y. lipolytica*.

Nuestros resultados muestran que la cafeína genera un aumento en la expresión de los genes *SOD1* y *SOD2*, *GPX*, *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* involucrados en la respuesta antioxidante, mostrando un patrón específico para cada uno comparable a lo obtenido en las muestras tratadas con H_2O_2 (como control positivo de estrés oxidativo) y cafeína + H_2O_2 (la mezcla de ambos compuestos, antioxidante y prooxidante). Dado que hay un aumento en la expresión de los genes encargados de la respuesta antioxidante se podría asumir que hay un aumento en la producción de ERO, es decir un desbalance entre moléculas antioxidantes y prooxidantes, lo que provoca el incremento en la actividad de las enzimas encargadas de reestablecer este balance. Sin embargo, no hay evidencia de que la producción de ERO aumente. Por otro lado, el aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante puede ser algo positivo para el organismo. Estudios previos acerca del efecto que el consumo de cafeína tiene sobre la actividad antioxidante se centran en analizar el efecto que este compuesto tiene sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. En el estudio de Abreu y colaboradores (2011), se encontró que el consumo crónico de cafeína aumenta la actividad de superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, lo que reduce la peroxidación lipídica en la membrana cerebral y por lo tanto reduce el daño en la función cognitiva a través de la modulación del sistema antioxidante endógeno en el cerebro (Abreu *et al.*, 2011). En este caso la cafeína se encargó de modular el sistema de defensa antioxidante lo que juega un papel importante en la protección del sistema biológico.

Los resultados que obtuvimos al someter a las células al efecto de los agentes cafeína y H_2O_2 muestran que hubo una regulación mediada por el tiempo de exposición al agente en la expresión de los genes de respuesta antioxidante. Se

observó que la respuesta transcripcional de dichos genes aumentó en las muestras tratadas durante tiempos cortos (alrededor de 15 y 30 min de tratamiento) considerando los mayores niveles de expresión de los genes analizados; posteriormente, a tiempos más largos de exposición (más de 30 min), la expresión de los genes disminuyó hasta alcanzar valores de expresión similares a su expresión basal (observada en las muestras correspondientes a las células sin tratamiento).

Cuando se habla de moléculas antioxidantes se refiere a aquellas moléculas que pueden prevenir la generación de especies oxidantes tal es el caso de antioxidantes como el tocoferol, el ácido ascórbico, carotenoides, flavonoides, etc. (Ali *et al.*, 2020). Como lo describen diversos autores, una de las cualidades de mayor importancia farmacológica de la cafeína es su capacidad de reducir el estrés oxidativo, contrarrestando el efecto de las ERO (Simoni da Silva *et al.*, 2018; Karuppagounder *et al.*, 2021). Sin embargo, de acuerdo con los resultados que obtuvimos, el posible efecto antioxidante de la cafeína puede ser considerado un efecto indirecto ya que actúa regulando la respuesta antioxidante y no previniendo la generación de ERO.

La regulación de la actividad de enzimas antioxidantes es debido a que estas se consideran primordiales en la defensa antioxidante, tal es el caso de las enzimas SOD las cuales actúan como captadores de radicales en casi todas las células expuestas a oxígeno (Ogueji *et al.*, 2020); en nuestros resultados los genes que codifican para estas enzimas fueron los que mostraron mayores niveles de expresión en respuesta a los agentes analizados. Este incremento en la actividad transcripcional de los genes de defensa antioxidante en presencia de cafeína se observa en particular en el gen *SOD2* ya que este mostró un incremento notorio lo que sugiere, en este caso, que la cafeína podría contrarrestar el estrés oxidativo al aumentar la actividad de SOD. Liu y colaboradores (2019) sugieren que la cafeína al ser combinada con la enzima SOD puede cambiar su conformación y microambiente lo que aumenta la actividad antioxidante de ambas moléculas por lo que la cafeína mostraría un

efecto indirecto (a través de la modificación de SOD) de protección contra el daño celular (Liu *et al.*, 2019). En otro estudio reciente se demostró que la cafeína mejora la actividad de SOD a través de un mecanismo indirecto que involucra la activación de la proteína SIRT3 que se encarga de modular la producción de ERO, con el fin de proteger a las células de la piel del daño oxidativo ocasionado por la radiación UV (Xu *et al.*, 2020).

Los resultados mostrados sugieren que el incremento en la actividad transcripcional del gen *SOD2* mediada por la exposición a la cafeína, representa un tercer mecanismo que podría contribuir a la explicación del efecto indirecto de la cafeína como antioxidante.

Con respecto al gen *GPX*, se pudo observar que éste también incrementó su expresión alcanzando los valores máximos a los 30 min de tratamiento con cafeína. Similar a lo observado para los genes que codifican para CAT, específicamente los genes *CAT2* y *CAT3* los cuales mostraron mayores niveles de expresión a los 15 min. En un estudio realizado por Alzoubi y colaboradores (2018), *GPX* y *CAT* se usaron como biomarcadores de estrés oxidativo en el hipocampo en un modelo de ratas. en este modelo, la administración crónica de L- metionina disminuye la actividad de estas enzimas y provoca un deterioro de la memoria a corto y largo plazo. Cuando los animales experimentales fueron expuestos al consumo de cafeína se encontró que dicho tratamiento evitó la disminución de la actividad de *GPX* y *CAT*, por lo que los autores concluyen que la cafeína tiene la capacidad de prevenir el deterioro en la memoria derivado del estrés oxidativo (Alzoubi *et al.*, 2018).

En la mayoría de los estudios en dónde se analiza el efecto de la cafeína sobre marcadores de estrés oxidativo se analiza la actividad de las enzimas SOD, *GPX* y *CAT* como referencia. Se ha observado que la cafeína tiene la capacidad de prevenir el estrés oxidativo (Simoni da Silva *et al.*, 2018; Metro *et al.*, 2017; Cakir *et al.*, 2017) y contrarrestar la formación de ERO (Simoni da Silva *et al.*, 2018). En nuestro estudio se analizó la expresión de los genes que codifican

para estas enzimas en *Y. lipolytica* y se observó que todos los genes mostraron cambios en su nivel de expresión.

Al comparar los resultados que obtuvimos en las muestras tratadas con cafeína con las muestras tratadas con H₂O₂ pudimos observar que, en respuesta a cada tratamiento, cada uno de los genes de respuesta antioxidante presenta un patrón de expresión con algunas variaciones en el tiempo de inicio de dichos cambios en la expresión.

En el caso de los genes que codifican para SOD (*SOD1* y *SOD2*), las muestras tratadas con H₂O₂ mostraron un aumento a partir de los 10 min. Mientras que, en las muestras tratadas con cafeína, la expresión de estos genes inició a los 30 min (*SOD1*) y 5 min (*SOD2*). En lo observado al analizar la expresión del gen *GPX* el aumento comenzó a partir de los 5 min de incubación. Los genes que codifican para CAT también mostraron un aumento siendo el gen *CAT2* el que mostró la mayor actividad a los 30 min de tratamiento.

La actividad de estas enzimas depende tanto del tiempo de exposición al agente oxidante como del tipo de especies reactivas de oxígeno que se encuentren en el ambiente celular lo cual está determinado por el tipo de daño al que la célula este sometida (Ighodaro & Akinloye, 2018). El tiempo de exposición al agente oxidante influye de manera importante en la respuesta de estos genes, algo similar a lo observado en un estudio realizado por Ridaoui y colaboradores en el que se utilizó el H₂O₂ como control positivo de daño para evaluar la actividad antioxidante de diversos aceites esenciales en células del hongo *Saccharomyces cerevisiae* y se encontró que en las células tratadas únicamente con H₂O₂ durante 1 h y sin la adición de ningún agente antioxidante mostraron un aumento en la actividad enzimática de CAT y SOD (Ridaoui *et al.*, 2021). En nuestros resultados, utilizando un modelo biológico diferente, se observa que el gen *CAT2* fue el que mostró una mayor respuesta al estrés inducido por el H₂O₂ lo que puede deberse a que la enzima catalasa es la que tiene mayor afinidad por esta molécula oxidante (Ighodaro & Akinloye, 2018). En *Saccharomyces cerevisiae* se ha observado que la actividad enzimática de

catalasa aumenta significativamente al inducirle estrés oxidativo a las células utilizando H_2O_2 (Vázquez *et al.*, 2018). En el caso de ambos genes que codifican para SOD, las muestras tratadas con peróxido mostraron un aumento a partir de los 10 min. En lo observado al analizar la expresión del gen *GPX* el aumento comenzó a partir de los 5 min de incubación. Esta diferencia en los resultados que obtuvimos y los resultados obtenidos por Ridaoui y colaboradores puede deberse a la diferencia entre el aumento entre la expresión de los genes y el comienzo de la actividad enzimática correspondiente. En un estudio realizado por Peters y colaboradores en el que se evaluó el aumento en la expresión de los genes SOD, CAT y GPX en células del hongo *Sporisorium scitamineum* tratadas con H_2O_2 se encontró un aumento en la expresión de los genes que codifican para estas enzimas a los 30 min de tratamiento mientras que a los 180 min de tratamiento no se encontraron diferencias significativas (Peters *et al.*, 2020).

No hay evidencia que demuestre que la cafeína tenga la capacidad de reducir el daño ya ocasionado por la exposición a un agente dañino, sin embargo, nuestros resultados muestran que la cafeína tiene la capacidad de inducir la respuesta antioxidante y generar un efecto protector para la célula. En nuestro trabajo encontramos que al incubar las células con la combinación de ambos agentes (cafeína y peróxido) también se encontró un incremento en la actividad transcripcional de los genes de respuesta antioxidante, sin embargo, esta actividad, aunque mostró un incremento estadísticamente significativo, no mostró un incremento acumulativo, lo que indica que la cafeína y el peróxido no generan un efecto sinérgico de daño celular. Se sugiere que la cafeína puede ejercer un papel protector para la célula aumentando la respuesta antioxidante cuando se utiliza en combinación con un agente oxidante. Resultados similares encontraron Zhang y colaboradores al analizar muestras de larvas de mosca (*Musca domestica larvae*) tratadas con una sustancia protectora conocida, en combinación un contaminante ambiental que inhibe el crecimiento celular. Los autores observaron que esta combinación aumentó la actividad de superóxido dismutasa lo que atenuó el daño oxidativo y reguló la actividad mitocondrial

(Zhang *et al.*, 2019). En otro estudio se observó que la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX aumenta en células tratadas con H₂O₂ y vino obtenido de distintas frutas con propiedades antioxidantes (arándano, mora y frambuesa) lo que sugiere un efecto protector por parte del vino de frutas contra el daño oxidativo inducido por el H₂O₂ (Cakar *et al.*, 2021).

De acuerdo con la literatura revisada se han descrito varios mecanismos por los cuales la cafeína genera un efecto protector contra el daño oxidativo por lo que se sugiere que la cafeína se puede catalogar como un antioxidante que actúa de manera indirecta. En nuestro modelo de estudio observamos una regulación (aumento) de las enzimas involucradas en la respuesta antioxidante. En general, se confirmó la hipótesis de que la cafeína modifica la expresión de estos genes, sin embargo no hay evidencia que indique que la cafeína pueda prevenir la generación de ERO ni reparar el daño celular o tisular ya sufrido, aún así, podríamos decir que puede reducir el efecto de oxidantes metabólicos al incrementar la actividad de enzimas antioxidantes, como se observa en los resultados obtenidos de este trabajo.

9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se utilizó un modelo de células eucariotas con el fin de analizar el efecto de la cafeína sobre la expresión de genes de respuesta antioxidante y se determinó que:

- La cafeína modula el sistema de defensa antioxidante al aumentar la expresión de los genes involucrados lo que juega un papel importante en la protección del sistema biológico.
- El aumento en la expresión de genes de respuesta antioxidante en presencia de cafeína es comparable a lo observado en las células tratadas con peróxido de hidrógeno.
- La actividad transcripcional de la mayoría de los genes alcanzó sus niveles máximos a los 15 minutos de exposición de las células a la cafeína (similar a lo observado con el peróxido de hidrógeno).
- Aunque con ambos agentes se incrementó el nivel de expresión de los genes, la combinación de cafeína y el peróxido no mostró un efecto sinérgico ni acumulativo en la respuesta antioxidante de *Y. lipolytica*.

La cafeína actúa como un antioxidante que aumenta la actividad transcripcional de los genes que codifican para enzimas de la respuesta celular antioxidante de *Y. lipolytica*. A pesar de que no hay evidencia que indique que la cafeína pueda prevenir la generación de ERO ni reparar el daño celular o tisular ya sufrido, se sugiere que la cafeína puede estar involucrada en un mecanismo indirecto encaminado a proteger a la célula del posible daño ocasionado por las ERO.

10. REFERENCIAS

- Abreu, R. V., Silva-Oliveira, E. M., Moraes, M. F. D., Pereira, G. S., & Moraes-Santos, T. (2011). Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 99(4), 659-664.
- Adekeye, A. O., Fafure, A. A., Jeje-Pius, S. T., Asuquo, D. O., Sanya, J. O., & Ogundipe, L. (2021). Caffeine abrogates oxidative stress imbalance: Its implication on lateral geniculate nucleus and visual cortex following hyaluronic acid exposure. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 117, 101996.
- Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of food biochemistry*, 44(3), e13145.
- Alzoubi, K. H., Mhaidat, N. M., Obaid, E. A., & Khabour, O. F. (2018). Caffeine prevents memory impairment induced by hyperhomocysteinemia. *Journal of molecular neuroscience*, 66(2), 222-228.
- Ashihara, H., & Suzuki, T. (2004). Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers in Bioscience*, 9, 1864-1876.
- Bakuradze, T., Lang, R., Hotman, T., *et al.* (2016). Coffee consumption rapidly reduces background DNA strand breaks in healthy humans: Results of a short-term repeated uptake intervention study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60, 682-686.

- Barcelos, P. B., Souza, M. A., Amaral, G. P., *et al.* (2014). Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. *Life Sciences*, 96, 40-45.
- Barcelos, R. P., Lima, F. D., Carvalho, N. R., Bresciani, G., & Royes, L. F. (2020). Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutrition Research*, 80, 1-17.
- Barnes, R. P. Fouquerel, E., & Opresko, P. L. (2019). The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 177, 37-45.
- Barth, G., & Gaillardin, C. (1997). Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology Reviews*, 19 (4), 219-237.
- Ben Waer, F., Laatar, R., Srihi, S., Jouira, G., Rebai, H., & Sahli, S. (2020). Acute effects of low versus high caffeine dose consumption on postural balance in middle-aged women. *Journal of women & aging*, 1-15.
- Bianchi, C., Kostygov, A. Y., Kraeva, N., Záhonová, K., Horáková, E., Sobotka, R., & Yurchenko, V. (2019). An enigmatic catalase of *Blastocrithidia*. *Molecular and biochemical parasitology*, 232, 111199.
- Bode, A. M., Dong, Z. (2007). The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Letters*, 247, 26-39.
- Bonita, J. S., Mandrano, M., Shuta, D., & Vinson, J. (2007). Coffee and cardiovascular disease: *in vitro*, cellular, animal, and human studies. *Pharmacological Research*, 55, 187-198.

- Buscemi, S., Marventano, S., Antoci, M., *et al.*, (2016). Coffe and metabolic impairment: an update review of epidemiological studies. *NFS Journal*, 3, 1-7.
- Cadet, J., & Wagner, R. (2013). DNA base damage by reactive oxygen species, oxidizing agents, and UV radiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Čakar, U., Čolović, M., Milenković, D., Medić, B., Krstić, D., Petrović, A., & Đorđević, B. (2021). Protective effects of fruit wines against hydrogen peroxide—induced oxidative stress in rat synaptosomes. *Agronomy*, 11(7), 1414.
- Cakir, O. K., Ellek, N., Salehin, N., Hamamcı, R., Keleş, H., Kayalı, D. G., ... & Özbeyli, D. (2017). Protective effect of low dose caffeine on psychological stress and cognitive function. *Physiology & behavior*, 168, 1-10.
- Campos-Góngora, E., Andaluz, E., Bellido, A., Ruiz-Herrera, J., Larriba, G. (2013). The RAD52 orthology of *Yarrowia lipolytica* is essential for nuclear integrity and DNA repair. *FEMS Yeast Research*, 441-452.
- Cano-Marquina, A., Tarín, J. J., & Cano, A. (2013). The impact of coffe on health. *Maturitas*, 75, 7-21.
- Castillo Roque, M. (2020). *La cafeína inhibe la expresión de genes involucrados en los mecanismos de reparación del daño al ADN*. [Tesis].

- Crippa, A., Discacciati, A., Larson, S., *et al.* (2014). Coffe consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: a dose-response meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 180(8), 763-775.
- da Silva, C. S., de Lima, R. D. C. G., Elekofehinti, O. O., Ogunbolude, Y., Duarte, A. E., Rocha, J. B. T., ... & Kamdem, J. P. (2018). Caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and improves locomotor behavior in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. *Chemico-biological interactions*, 282, 77-84.
- Desentis Desentis, F. (2015). *Expresión de genes que codifican para enzimas de la respuesta antioxidante de Yarrowia lipolytica, bajo condiciones de estrés oxidativo*. [Tesis]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/13829>.
- Ding, M., Bhupathiraju, S. N., Chen, M., van Dam, R. M., & Hu, F. B. (2014). Caffeinated and decaffeinated coffe consumption and risk of type 2 diabetes: a systematic review and a dose-response meta-analysis. *Diabetes Care*, 37, 569-586.
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., & Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox biology*, 6, 183-197.
- Farina, M., & Aschner, M. (2019). Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*.

- Farooq, M., Ahmad, R., Shahzad, M., Sajjad, Y., Hassan, A., Shah, M. M., ... & Khan, S. A. (2021). Differential variations in total flavonoid content and antioxidant enzymes activities in pea under different salt and drought stresses. *Scientia Horticulturae*, 287, 110258.
- Finn, K., Lowndes, N. F., & Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 1447-1473.
- Fleming, A. M., & Burrows, C. J. (2017). Formation and processing of DNA damage substrates for the hNEIL enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 107, 35-52.
- Gaspar, S., Ramos, F. (2016). Caffeine: Consumption and health effects. *Encyclopedia of Food and Health*, 573-578.
- Gebicka, L., & Krych-Madej, J. (2019). The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. *Journal of inorganic biochemistry*, 197, 110699.
- Georgalas, V. L., Kalantzi, N., Harpur, I., & Kenny, C. (2021). The Effects of Caffeine on Voice: A Systematic Review. *Journal of Voice*.
- Goldstein, E. R., Ziegenfuss, T., Kalman, D., et al. (2010). International society of sports nutrition position stand: caffeine and performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 7 (5).
- Gormally, B. M. G., Fuller, R., McVey, M., & Romero L. M. (2019). DNA damage as an indicator of chronic stress: Correlations with corticosterone and uric acid. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 227, 116-122.

- Grgic, J., Grgic, I., Pickering, C., Schoenfeld, B. J., Bishop, D. J., & Pedisic, Z. (2020). Wake up and smell the coffee: caffeine supplementation and exercise performance—an umbrella review of 21 published meta-analyses. *British Journal of Sports Medicine*, *54*(11), 681-688.
- Griess, B., Tom, E., Domann, F., & Teoh-Fitzgerald, M. (2017). Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, *112*, 464-479.
- Grosso, G., Godos, J., Galvano, F., & Giovannucci, E. L. (2017). Coffee, caffeine, and health outcomes: an umbrella review. *Annual review of nutrition*, *37*, 131-156.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, *94*(3), 651-715.
- Heckman, M. A., Weil, J., & Gonzalez, M. (2010). Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *Journal of Food Science*, *75*(3), 77-87.
- Hejazi, I. I., Khanam, R., Mehdi, S. H., Bhat, A. R., Rizvi, M. M. A., Islam, A., ... & Athar, F. (2017). New insights into the antioxidant and apoptotic potential of *Glycyrrhiza glabra* L. during hydrogen peroxide mediated oxidative stress: an in vitro and in silico evaluation. *Biomedicine & pharmacotherapy*, *94*, 265-279.
- Hunyadi, A. (2019). The mechanism (s) of action of antioxidants: From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the

- generation of bioactive secondary metabolites. *Medicinal research reviews*, 39(6), 2505-2533.
- Ighodaro, O. M. (2018). Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 656-662.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293.
- Jeon, J. S., Kim, H. T., Jeong, I. H., Hong, S. R., Oh, M. S., Yoon, M. H., ... & Abd El-Aty, A. M. (2019). Contents of chlorogenic acids and caffeine in various coffee-related products. *Journal of advanced research*, 17, 85-94.
- Kaczmarczyk-Sedlak, I., Folwarczna, J., Sedlak, L., Zych, M., Wojnar, W., Szumińska, I., ... & Mrukwa-Kominek, E. (2019). Effect of caffeine on biomarkers of oxidative stress in lenses of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Archives of medical science: AMS*, 15(4), 1073.
- Kara, M., Patlar, S., Stoffregen, T. A., & Erkmen, N. (2018). Effect of caffeine on standing balance during perceptual-cognitive tasks. *Malaysian Journal of Movement, Health & Exercise*, 7(2).
- Kleber Silveira, A., Moresco, K. S., Mautone Gomes, H., da Silva Morrone, M., Kich Grun, L., Pens Gelain, D., ... & Fonseca Moreira, J. C. (2018). Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) alters gut microbiota and modulates redox status, partially via caffeine in Wistar rats. *Phytotherapy Research*, 32(12), 2466-2474.

- Kocabay, A. E., Kost, L., Gehlhar, M., Rodel, G., & Gey, U. (2019). Mitochondrial Sco proteins are involved in oxidative stress defense. *Redox Biology*, 21.
- Laatar, R., Waer, F. B., Rebai, H., & Sahli, S. (2021). Caffeine consumption improves motor and cognitive performances during dual tasking in middle-aged women. *Behavioural Brain Research*, 412, 113437.
- Lam, J., & McKeague, M. (2019). Dietary modulation of mitochondrial DNA damage: implications in ageing and associated diseases. *Journal Of Nutritional Biochemistry*, 63, 1-10
- León-Carmona, J. R., & Galano, A. (2011). Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals?. *The Journal of Physical Chemistry*, 115, 4538-4546.
- Li, C., Shi, L., Chen, D., Ren, A., Gao, T., & Zhao, M. (2015). Functional analysis of the role of glutathione peroxidase (GPx) in the ROS signaling pathway, hyphal branching and the regulation of ganoderic acid biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *Fungal Genetics and Biology*, 82, 168-180.
- Li, H., Roxo, M., Cheng, X., Zhang, S., Cheng, H., & Wink, M. (2019). Pro-oxidant and lifespan extension effects of caffeine and related methylxanthines in *Caenorhabditis elegans*. *Food chemistry: X*, 1, 100005.

- Li, Y. F., Ouyang, S. H., Tu, L. F., Wang, X., Yuan, W. L., Wang, G. E., ... & He, R. R. (2018). Caffeine protects skin from oxidative stress-induced senescence through the activation of autophagy. *Theranostics*, 8(20), 5713.
- Liu, H., Ji, X., Huang, H. (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, 33, 1522-1546.
- Liu, R., Gang, L., Shen, X., Xu, H., Wu, F., & Sheng, L. (2019). Binding characteristics and superimposed antioxidant properties of caffeine combined with superoxide dismutase. *ACS omega*, 4(17), 17417-17424.
- Luo, H., Chiang, H. H., Louw, M., Susanto, A., & Chen, D. (2017). Nutrient sensing and the oxidative stress response. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(6), 449-460.
- Machado, S., Sá Filho, A. S., Campos, C., de Paula, C. C., Bernardes, F., Murillo-Rodriguez, E., ... & Lattari, E. (2020). Can caffeine intake combined with aerobic exercise lead to improvement in attentional and psychomotor performance in trained individuals?. *IBRO reports*, 8, 76-81.
- Magenta, A., Dellambra, E., Ciarapica, R., & Capogrossi, M. C. (2016). Oxidative stress, microRNAs and cytosolic calcium homeostasis. *Cell Calcium*, 60, 207-217
- Magwood, A. C., Mundia, M. M., Pladwig, S. M., Mosser, D. D., & Baker, M. D. (2020). The dichotomous effects of caffeine on homologous recombination in mammalian cells. *DNA repair*, 88, 102805.

- Martyn, D., Lau, A., Richardson, P., & Roberts, A. (2018). Temporal patterns of caffeine intake in the United States. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 71-83.
- McLellan, T., Caldwell, J. A., & Lieberman, H. R. (2016). A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 71, 294-312.
- Meng, D., Zhang, P., Zhang, L., Wang, H., Ho, C. T., Li, S., Zhao, H. (2017). Detection of cellular redox reactions and antioxidant activity assays. *Journal of Functional Foods*, 37, 467-479.
- Metro, D., Cernaro, V., Santoro, D., et al. (2017). Beneficial effects of oral pure caffeine on oxidative stress. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology*, 10, 22-27.
- Miranda Roblero, H. (2016). *El envejecimiento modifica la expresión de genes de respuesta antioxidante en Yarrowia lipolytica*. [Tesis]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/13875>.
- Mondal, M., Kundu, S. K., Islam, M. T., Reiner, Ž., Martorell, M., & Sharifi-Rad, J. (2021). Protective effect of *Bridelia tomentosa* due to its phenolic acids and flavonoids against oxidative stress-mediated hepatic toxicity induced by carbofuran. *South African Journal of Botany*, 141, 447-456.

- Morde, A., Sudhakar, K., Rambabu, M., Shankar, A., Rai, D., Pawar, K., ... & Padigaru, M. (2021). Pharmacokinetic profile of a novel sustained-release caffeine with extended benefits on alertness and mood: A randomized, double-blind, single-dose, active-controlled, crossover study. *Current Research in Behavioral Sciences*, 2, 100036.
- Muhammed, B. L., Seid, M. H., & Habte, A. T. (2021). Determination of Caffeine and Hydrogen Peroxide Antioxidant Activity of Raw and Roasted Coffee Beans Around Habru Woreda, Ethiopia Using UV-Vis Spectroscopy. *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, 13, 101.
- Muñoz-Peñuela, M., Lo, F., Dal'Olio, A., *et al.* (2021). Diclofenac and caffeine inhibit hepatic antioxidant enzymes in the freshwater fish *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 240, 108910.
- Nawrot, P., Jordan, J., Eastwood, J., Rotsein, J., Hugenholtz, A., Feeley, M. (2010). Effects of caffeine on human health. *Food Additives & Contaminants*, 20(1), 1 - 30.
- Nehlig, A. (2018). Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacological reviews*, 70(2), 384-411.
- O'Neil, M. (2013). The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. (15th edition) Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc.

- Olson, K. R., Gao, Y., DeLeon, E. R., Arif, M., Arif, F., Arora, N., & Straub, K. D. (2017). Catalase as a sulfide-sulfur oxido-reductase: an ancient (and modern?) regulator of reactive sulfur species (RSS). *Redox biology*, 12, 325-339.
- Onaolapo, O. J., & Onaolapo, A. Y. (2020). Caffeine, Sleep, and Antioxidant Status. In *Neurological Modulation of Sleep* (pp. 265-274). Academic Press.
- Oñatibia-Astibia, A., Martínez-Pinilla, E., & Franco, R. (2016). The potential of methylxanthine-based therapies in pediatric respiratory tract diseases. *Respiratory Medicine*, 112, 1-9.
- Ouephanit, C., Boonvitthya, N., Theerachat, M., Bozonnet, S., Chulalaksananukul, W. (2019). Efficient expression and secretion of endo-1,4- β -xylanase from *Penicillium citrinum* in non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* directed by the native and the preproLIP2 signal peptides. *Protein Expression and Purification*, 160, 1-6.
- Papas, M., Arroyo, L., Bassols, A., Catalán, J., Bonilla-Correal, S., Gacem, S., ... & Miró, J. (2019). Activities of antioxidant seminal plasma enzymes (SOD, CAT, GPX and GSR) are higher in jackasses than in stallions and are correlated with sperm motility in jackasses. *Theriogenology*, 140, 180-187.
- Pardo Lozano, R., alvarez García, Y., Tafalla, D. B., & Albaladejo, M. F. (2007). Caffeine: a nutrient, a drug or a drug of abuse. *Adicciones*, 19(3).

- Patterson, K., Yu, J., Landberg, J. (2018). Functional genomics for the oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*, 48, 184-196.
- Perez, M., Robbins, M., Revhaug, C., Sausgs (2019). Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period. *Free Radical Biology and Medicine*, 14, 61-72
- Pérez-Campo, F. M., & Domínguez, A. (2001). Factors affecting the morphogenetics switch in *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 43, 429-433.
- Peters, L. P., Teixeira-Silva, N. S., Bini, A. P., Silva, M. M. L., Moraes, N., Crestana, G. S., ... & Monteiro-Vitorello, C. B. (2020). Differential responses of genes and enzymes associated with ROS protective responses in the sugarcane smut fungus. *Fungal Biology*, 124(12), 1039-1051.
- Petrucci, R., Zollo, G., Curulli, A., & Marrosu, G. (2018). A new insight into the oxidative mechanism of caffeine and related methylxanthines in aprotic medium: May caffeine be really considered as an antioxidant?. *BBA-General Subjects*, 1862, 1781-1789.
- Poltev, V. I., Grokhlina, T. I., González, E., *et al.* (2004). The study of three-dimensional structure of caffeine associates using computational and experimental methods. *Journal of Molecular Structure*, 709, 123-128.
- Quiñones González, C. A. (2018) *Respuesta antioxidante de Yarrowia lipolytica en ausencia del gen CAT3*. [Tesis]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/16388>.

- Quiñones-González, C. A., Arredondo-Mendoza, G. I., Jiménez-Salas, Z., Larriba-Calle, G., Ruiz-Herrera, J., & Campos-Góngora, E. (2019). Genotoxic effect of caffeine in *Yarrowia lipolytica* cells deficient in DNA repair mechanisms. *Archives of microbiology*, 201(7), 991-998.
- Ramasarma, T., & Vaigundan, D. (2019). Pathways of electron transfer and proton translocation in the action of superoxide dismutase dimer. *Biochemical and biophysical research communications*, 514(3), 772-776.
- Reichert, C. F., Veitz, S., Bühler, M., Gruber, G., Deuring, G., Rehm, S. S., ... & Weibel, J. (2021). Wide awake at bedtime? Effects of caffeine on sleep and circadian timing in male adolescents—a randomized crossover trial. *Biochemical Pharmacology*, 191, 114283.
- Reyes, C. M., & Cornelis, M. C. (2018). Caffeine in the diet: country-level consumption and guidelines. *Nutrients*, 10(11), 1772.
- Robertson, T. M., Cliafford, M. N., Penson, S., Chope, G., & Robertson, M. D. (2015). A single serving of caffeinated coffee impairs postprandial glucose metabolism in overweight men. *British Journal of Nutrition*, 114, 1218-1225.
- Rodríguez Teniente, S. (2018). *Estrés oxidativo en Yarrowia lipolytica cultivada con diferentes fuentes de carbono*. [Tesis]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/17812>.

- Ruyskensvelde, V., Breusegem, F., Kelen, K. (2018). Post-transcriptional regulation of the oxidative stress response in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 122, 181-192.
- Sarriá, B., Martínez-López, S., Sierra-Cinos, J. L., *et al.* (2018). Regularly consuming a green/roasted coffee blend reduces the risk of metabolic syndrome. *European Journal of Nutrition*, 57, 269-278.
- Shearer, J., & Graham, T. E. (2014) Performance effects and metabolic consequences of caffeine and caffeinated energy drink consumption on glucose disposal. *Nutrition Reviews*, 72(1), 121-136.
- Shi, L., Shu, X., Li, H., *et al.* (2013). Physical activity, smoking, and alcohol consumption in association with incidence of type 2 diabetes among middle-aged and elderly Chinese men. *PLoS ONE*, 8(11).
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 122-126.
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 86, 715-748.
- Sifuentes Gaspar, E. (2014). *Efecto genotóxico de la cafeína sobre células de Yarrowia lipolytica deficientes en los mecanismos de reparación del ADN*. [Tesis]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/4367>.
- Sjakste, N., Djelić, N., Dzintare, M., & Živković, L. (2020). DNA-BINDING and DNA-protecting activities of small natural organic molecules and food extracts. *Chemico-biological interactions*, 323, 109030.

- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2018). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*.
- Stefanello, N., Spanevello, R. M., Passamonti, S., *et al.* (2019). Coffe, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 298-313.
- Tai, M., Stephanopoulos, G. (2013). Engineering the push and pull of lipid biosynthesis in oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for biofuel production. *Metabolic Engineering*, 15, 1-9.
- Tao, L., Cao, Y., Wei, Z., *et al.* (2017). Xanthatin triggers Chk1-mediated DNA damage response and destabilizes Cdc25C via lysosomal degradation in lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 337, 85-94.
- Tehrani, H. S., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in biophysics and molecular biology*, 140, 5-12.
- Tej, G. N. V. C., & Nayak, P. K. (2018). Mechanistic considerations in chemotherapeutic activity of caffeine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 312-319.
- Temple, J.L., Bernard, C., Lipshultz, S.E. (2017). The safety of ingested caffeine: a comprehensive review
- Trayhurn, P. (2017). Oxygen - the forgotten nutrient. *Journal of Nutritional Science*, 6(47).
- Tsujimoto, T., Kajio, H., & Sugiyama, T. (2017). Association between caffeine intake and all-cause and cause-specific mortality: a population-based prospective cohort study. *Mayo Clinic Proceedings*, 92 (8), 1190-1202.

- Tuy, K., Rickenbacker, L., & Hjelmeland, A. B. (2021). Reactive oxygen species produced by altered tumor metabolism impacts cancer stem cell maintenance. *Redox Biology*, 101953.
- Uno, U. U., Umoyen, A. J., & Ekaluo, U. B. (2018). Mitigating Effect of Honey on Caffeine Induced Oxidative Stress in Male Albino Rats. *Journal of Scientific Research and Reports*, 1-7.
- Van Houten, B., Santa-Gonzalez, G. A., & Camargo, M. (2018). DNA repair after oxidative stress: Current challenges. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 9-16.
- Varma, S. D., Hegde, K. R., & Kovtun, S. (2010). Oxidative stress in lens in vivo: Inhibitory effect of caffeine. A preliminary report. *Molecular Vision*, 16, 501-505.
- Verbeke, J., Beopoulos, A., Nicaud, J. (2013). Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnology Letters*, 35, 571-576.
- Vieira, A. J. S. C., & Santos, P. M. P. (2017). A Tentative Classification of Antioxidants: Which Role They Play when Protecting Biological Targets from Oxidative Stress Induced Damage. *J Med Chem Drug Des*, 1(1).
- Vieira, A. J., Gaspar, E. M., & Santos, P. M. (2020). Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine. *Radiation Physics and Chemistry*, 174, 108968.

- Vieira, J. M., Gutierrez, J. M., Carvalho, F. B., *et al.* (2018). Caffeine and high intensity exercise: impact on purinergic and cholinergic signalling in lymphocytes and on cytokine levels. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 108, 1731-1738.
- Villarreal García, M. (2020). *Expresión de los genes CAT1 y CAT2 bajo condiciones de estrés oxidativo, en células de Yarrowia lipolytica carentes del gen CAT3*. [Tesis]. <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/20761>.
- Wang, J., & Dong, W. (2018). Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia. *Gene*, 678, 177-183.
- Wang, L., Kuang, Z., Zhang, D., Gao, Y., Ying, M., & Wang, T. (2021). Reactive oxygen species in immune cells: A new antitumor target. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110978.
- Weinberg, B., & Bealer, B. (2002). *The World of Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug*.
- Wikoff, D., Welsh, B. T., Henderson, R., *et al.* (2017). Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 585-648.
- Wilson, C. (2018). The clinical toxicology of caffeine: a review and case study. *Toxicology Reports*, 5, 1140-1152.
- Xu, H., Gan, C., Gao, Z., Huang, Y., Wu, S., Zhang, D., ... & Sheng, J. (2020). Caffeine targets SIRT3 to enhance SOD2 activity in mitochondria. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 822.

- Xu, H., Wang, L., Shi, B., Hu, L., Gan, C., Wang, Y., ... & Sheng, J. (2020). Caffeine inhibits the anticancer activity of paclitaxel via down-regulation of α -tubulin acetylation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 129, 110441.
- Yu, H., Deng, W., Zhang, D., Gao, Y., Yang, Z., Shi, X., ... & Ji, H. (2017). Antioxidant defenses of *Onychostoma macrolepis* in response to thermal stress: insight from mRNA expression and activity of superoxide dismutase and catalase. *Fish & shellfish immunology*, 66, 50-61.
- Yu, L., Chen, Y., & Chen, H. (2017). H₂O₂ -responsive theranostic nanomedicine. *Chinese Chemical Letters*, 28, 1841-1850.
- Zhang, X., Nie, M., Chen, J., Wei, L., Hua, Q. (2019). Multicopy integrants of *crt* genes and co-expression of AMP deaminase improve lycopene production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biotechnology*, 289, 46-54.

11. ANEXOS

Anexo 1

Gen	Tratamiento	Valor de p			
		YPD	Cafeína	H ₂ O ₂	Cafeína + H ₂ O ₂
<i>SOD1</i>	YPD	-	1.000	0.139	0.165
	Cafeína	1.000	-	0.017*	0.017*
	H ₂ O ₂	0.139	0.017*	-	0.996*
	Cafeína + H ₂ O ₂	0.165	0.017*	0.996	-
<i>SOD2</i>	YPD	-	0.005**	0.108	0.005**
	Cafeína	0.005**	-	0.177	1.000
	H ₂ O ₂	0.108	0.177	-	0.181
	Cafeína + H ₂ O ₂	0.005**	1.000	0.181	-
<i>GPX</i>	YPD	-	0.001***	0.000***	0.000***
	Cafeína	0.001***	-	0.000***	0.141
	H ₂ O ₂	0.000***	0.000***	-	0.000***
	Cafeína + H ₂ O ₂	0.000***	0.141	0.000***	-
<i>CAT1</i>	YPD	-	0.000***	0.911	0.121
	Cafeína	0.000***	-	0.000***	0.000***
	H ₂ O ₂	0.911	0.000***	-	0.997
	Cafeína + H ₂ O ₂	0.121	0.000***	0.997	-
<i>CAT2</i>	YPD	-	0.000***	0.000***	0.000***
	Cafeína	0.000***	-	0.038*	0.231
	H ₂ O ₂	0.000***	0.038*	-	0.589
	Cafeína + H ₂ O ₂	0.000***	0.231	0.589	-
<i>CAT3</i>	YPD	-	0.000***	0.285	0.000***
	Cafeína	0.000***	-	0.000***	0.000***
	H ₂ O ₂	0.285	0.000***	-	0.001***
	Cafeína + H ₂ O ₂	0.000***	0.000***	0.001***	-

Los valores de p se obtuvieron mediante la prueba de ANOVA al comparar los diferentes tratamientos con el control (YPD). Un solo asterisco (*) indica el valor de $p < 0.05$, dos asteriscos (**) indican el valor de $p < 0.01$, tres asteriscos (***) indican el valor de $p < 0.001$.