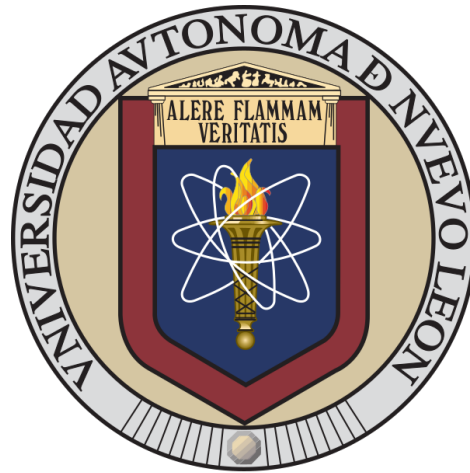


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EFFECTO DE LA CAFEÍNA EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA  
RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica***

**Por**

**PAULETTE RASCON GODARD**

**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**Monterrey, Nuevo León**

**Diciembre, 2024**

**Tesis de Posgrado**

**EFFECTO DE LA CAFEÍNA EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA  
RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica***

**Presentada por:**

**LNCA. PAULETTE RASCON GODARD**

**Como requisito para obtener el grado de:**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**Director de tesis: DR. EDUARDO CAMPOS GÓNGORA**

**MONTERREY, NUEVO LEÓN**

**DICIEMBRE 2024**

**EFFECTO DE LA CAFEÍNA EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA  
RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica***

**Aprobación de tesis**

---

Dr. Eduardo Campos Góngora

**Presidente**

---

Dr. Zacarías Jiménez Salas

**Secretario**

---

MCN. Joselina Huerta Oros

**Vocal**

---

Dra. Blanca Edelia González Martínez

**Subdirectora de Investigación, Innovación y Posgrado**

## COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El Comité de Evaluación de Tesis **APROBÓ** la tesis titulada: “**EFFECTO DE LA CAFEÍNA EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica***”, presentada por la LNCA. Paulette Rascon Godard con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Monterrey, Nuevo León a 16 de octubre de 2024.

---

Dr. Zacarías Jiménez Salas  
Presidente

---

Dr. Eduardo Campos Góngora  
Secretario

---

MCN. Joselina Huerta Oros  
Vocal



FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN

**DRA. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ**  
SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO  
P R E S E N T E.-

Estimada Dra. González Martínez, por este conducto le comunico que se han atendido e incorporado las recomendaciones realizadas por los miembros del Comité de Evaluación de la tesis titulada: **“Efecto de la cafeína en la regulación transcripcional de la respuesta antioxidante en células de *Yarrowia lipolytica*”**, la cual presenta la LNCA. Paulette Rascon Godard, como un requisito para la obtención de su grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro asunto en particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

*“Alere Flammam Veritatis”*

Monterrey, Nuevo León a 18 de octubre de 2024

**DR. EDUARDO CAMPOS GÓNGORA**  
DIRECTOR DE TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Av. Dr. Eduardo Aguirre Pequeño y Yuriria, Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México, C.P. 64460

81 1340 4890 • [www.faspyn.uanl.mx](http://www.faspyn.uanl.mx)

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida por permitirme haber llegado hasta aquí.

A mi madre y a mi abuela por ser los pilares de mi vida, las mujeres más valientes y trabajadoras que conozco y siempre apoyarme para lograr cualquier meta que me proponga.

A mi hermano por ser un gran amigo y ayudarme a tener fuerza en mí.

A cualquier otro miembro de mi familia que en algún momento me haya brindado su apoyo para recorrer mi camino personal y profesional.

A Rodrigo por ser mi compañero en este viaje llamado vida y enseñarme qué es el amor de pareja.

A mis amigas desde la secundaria, especialmente Paola, porque sin saberlo, me lograron sacar una sonrisa en los momentos más difíciles.

A mi director de tesis, el doctor Eduardo Campos, por haberme ayudado a alcanzar este logro, por siempre tener la disposición de enseñar e impulsarme a ser mejor estudiante y por brindarme su apoyo tanto académica como personalmente.

Al doctor Zacarías Salas por aconsejarme, escucharme y ayudarme a no perder la motivación y no darme por vencida.

A todos los demás profesores con los que coincidí a lo largo de la maestría por sus enseñanzas y sus palabras de apoyo.

A mis amigas de la maestría: Damaris, Miranda y Karla por brindarme su apoyo en todo este proceso y a sentirme acompañada en momentos difíciles. Sin duda hicieron que la maestría fuera una mejor experiencia para mí.

A los estudiantes con los que coincidí en el laboratorio de Proteómica por hacer que el trabajo se sintiera menos pesado.

A CONAHCYT por el apoyo brindado para poder realizar mis estudios de posgrado.

A mí misma por perseguir mis sueños y siempre intentar ser mejor.

## DEDICATORIA

### **A mi familia:**

Paulette Godard Ventura

Adelaida Ventura Hernández

Jean Paul Villafaña Godard

Esmeralda Hernández Soberano

Delio Nemesio Godard Ventura

Evelyne Damaris

### **A él:**

Rodrigo Gustavo Morales Espinosa

## CONTENIDO

1.	LISTA DE TABLAS .....	4
2.	LISTA DE FIGURAS .....	5
3.	LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	6
4.	RESUMEN .....	8
5.	ABSTRACT .....	10
6.	INTRODUCCIÓN.....	11
7.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	13
8.	ANTECEDENTES .....	14
8.1	Estrés oxidativo (EOx).....	14
8.1.1	Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	14
8.1.2	Antioxidantes.....	15
8.1.2.1	Antioxidantes enzimáticos .....	15
8.1.2.1.1	Superóxido dismutasa (SOD).....	15
8.1.2.1.2	Catalasas (CAT).....	16
8.1.2.1.3	Glutación peroxidasa (GPX).....	16
8.1.2.2	Antioxidantes no enzimáticos .....	16
8.1.2.2.1	Vitaminas (A, C y E).....	16
8.1.2.2.2	Glutación .....	17
8.1.2.2.3	Minerales (selenio, zinc, manganeso) .....	17
8.1.2.2.4	Compuestos bioactivos.....	18
8.2	Cafeína .....	18
8.2.1	Estructura química de la cafeína .....	19
8.2.2	Consumo de cafeína.....	19
8.2.3	Metabolismo de la cafeína.....	20
8.2.4	Efectos fisiológicos de la cafeína en el ser humano .....	20
8.2.5	La cafeína como molécula antioxidante.....	21
8.3	Uso de organismos modelo para estudiar procesos biológicos .....	22
8.3.1	Efectos de la cafeína utilizando levaduras como modelo de estudio .....	22
8.4	Factores de transcripción (FT) .....	23



8.4.1 Principales FT asociados a estrés, descritos en levaduras .....	25
8.4.1.1 Función de Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 .....	25
9. JUSTIFICACIÓN .....	26
10. HIPÓTESIS .....	28
11. OBJETIVOS .....	28
11.1 Objetivo general.....	28
11.2 Objetivos específicos .....	28
12. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO.....	29
13. MÉTODOS .....	30
13.1 Diseño del estudio .....	30
13.2 Procedimiento experimental .....	30
13.2.1 Cultivos celulares y preparación de medios de cultivo .....	30
13.2.1.1 Preparación y ajuste del preinóculo según la OD .....	30
13.2.2 Tratamientos .....	31
13.2.2.1 Grupo control.....	31
13.2.2.2 Tratamiento con cafeína .....	32
13.2.2.3 Tratamiento térmico.....	32
13.2.2.4 Estrés osmótico.....	32
13.2.2.5 Estrés oxidativo .....	32
13.2.3 Obtención y procesamiento del material genético .....	33
13.2.3.1 Extracción de ácidos nucleicos .....	33
13.2.3.2 Aislamiento del ARN.....	34
13.2.3.3 Síntesis de ADNc .....	35
13.2.4 Análisis de la expresión de genes por RT-PCR.....	36
13.2.4.1 Diseño de primers para los genes <i>YAP1</i> , <i>SKN7</i> , <i>MSN2</i> y <i>MSN4</i> .....	36
13.2.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
13.2.4.3 Análisis de productos de PCR: electroforesis en geles de agarosa.....	38
13.2.4.4 Obtención de los valores de expresión por densitometría de banda .....	39
13.3 Análisis .....	39
13.3.1 Análisis estadístico.....	39
13.3.2 Consideraciones éticas .....	39

13.3.3 Consideraciones de bioseguridad.....	39
14. RESULTADOS.....	41
14.1 Estandarización de las condiciones de PCR.....	41
14.2 Aislamiento de ARN.....	43
14.3 Análisis de la expresión de los genes correspondientes a los FT .....	44
15. DISCUSIÓN .....	49
16. CONCLUSIONES.....	55
17. REFERENCIAS.....	56

## 1. LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
1	Componentes para la digestión enzimática con DNAsa	35
2	Componentes para la reacción 1 de síntesis de ADNc	36
3	Componentes para la reacción 2 de síntesis de ADNc	36
4	Componentes para la reacción de PCR	37
5	Condiciones usadas para las reacciones de PCR	38
6	Características de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR	42
7	Niveles de expresión de los genes <i>YAP1</i> , <i>SKN7</i> , <i>MSN2</i> y <i>MSN4</i> en células sometidas a diferentes tipos de estrés	44

## 2. LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Nombre</b>	<b>Página</b>
1	Estructura química de la cafeína	19
2	Estrategia general de trabajo	29
3	Electroforesis en geles de agarosa (2%) de productos de PCR con los diferentes primers diseñados	42
4	Análisis por PCR de la eficiencia del tratamiento con la enzima DNasa	43
5	Niveles de expresión del gen <i>YAP1</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> , sometidas a diferentes tipos de estrés.	45
6	Niveles de expresión del gen <i>SKN7</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> , sometidas a diferentes tipos de estrés.	46
7	Niveles de expresión del gen <i>MSN2</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> , sometidas a diferentes tipos de estrés.	47
8	Niveles de expresión del gen <i>MSN4</i> en células de <i>Y. lipolytica</i> , sometidas a diferentes tipos de estrés.	48

### 3. LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AN	Ácidos nucleicos
ANOVA	Análisis de varianza (prueba estadística)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Buffer TAE	Solución amortiguadora Tris, acetato y EDTA
CAT	Catalasa
Cf	Concentración final
Ci	Concentración inicial
DNAsa	Enzima desoxirribonucleasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EOx	Estrés Oxidativo
<i>et al.</i>	<i>Et alii.</i> "Y otros"
FaSPyN	Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL
FT	Factores de Transcripción
g	Gramos
GPX	Glutación peroxidasa
h	Horas
H <sub>2</sub>	Hidrógeno
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
M	Concentración Molar
mg	miligramos
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Concentración Milimolar
mOsm	Miliosmoles

NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
O <sub>2</sub>	Oxígeno
°C	Grados Celsius
OD <sub>600</sub>	Densidad óptica determinada a 600 nm
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
Primer F	Primer forward (Diseñado sobre la cadena 5' → 3')
Primer R	Primer reverse (Diseñado sobre la cadena 3' → 5')
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
SOD	Superóxido dismutasa
Tx	Tratamiento
UV	Ultravioleta
Vf	Volumen final
Vi	Volumen inicial
YPD	Medio de cultivo ( <i>Yeast extract, Peptone, Dextrose</i> )
µg	Microgramos
µL	Microlitros

#### 4. RESUMEN

El estrés oxidativo (EOx) es una condición provocada por la excesiva presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una cantidad insuficiente de mecanismos antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) para combatirla, propiciando el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. La cafeína es capaz de estimular la expresión de genes que codifican para las enzimas catalasas, superóxido dismutasas, glutatión peroxidasa (respuesta celular antioxidante) en el organismo modelo *Yarrowia lipolytica*; aunque se desconocen los mecanismos reguladores de la expresión de éstos. Factores de transcripción (FT) como Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4, regulan la expresión de genes antioxidantes ante diferentes condiciones de estrés, en diferentes especies de levaduras; aunque se desconoce cuál es el mecanismo de regulación de la respuesta antioxidante estimulada por cafeína. Para determinar cuál es el FT responsable de la regulación de la respuesta celular a cafeína, células de la cepa P01a de la levadura *Y. lipolytica*, se sometieron a diferentes tipos de estrés (oxidativo, térmico, osmótico, presencia de cafeína), y posteriormente se analizó el patrón de expresión de los genes (*YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4*) que codifican para los FT mencionados.

Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias en la expresión de ninguno de los genes (prueba ANOVA de una vía), en las células sometidas a los diferentes tipos de estrés, cuando éstos se compararon con la expresión de los genes en las células consideradas como grupo control (células cultivadas en medio YPD). Estos hallazgos sugieren que la cafeína no modifica el patrón de expresión de los genes correspondientes a los FT (Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4).

Algo que se debe mencionar es que, a pesar de no haber observado diferencias estadísticamente significativas en el nivel de expresión de los genes, los niveles de expresión de *MSN2* y *MSN4* fueron mayores en el tratamiento control (medio YPD) que en los tratamientos con agentes inductores de estrés. Se ha mencionado en la literatura que el medio YPD al contener 2% de glucosa puede inducir estrés nutricional en las células de *Yarrowia lipolytica*, por esta razón se puede concluir que fue un error metodológico haber usado medio YPD como grupo control y se propone que usar un medio con una menor concentración de glucosa o un medio mínimo en nutrientes podría

ser utilizado como grupo control para efectos de analizar lo que se propone en este trabajo.



## 5. ABSTRACT

Oxidative stress (OS) is a condition caused by an excessive presence of reactive oxygen species (ROS) and an insufficient amount of antioxidant mechanisms (enzymatic and non-enzymatic) to counteract it, promoting the development of chronic-degenerative diseases. Caffeine can stimulate the expression of genes that encode catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase enzymes (cellular antioxidant response) in the model organism *Yarrowia lipolytica*; however, the regulatory mechanisms of their expression remain unknown. Transcription factors (TFs) such as Yap1, Skn7, Msn2, and Msn4 regulate the expression of antioxidant genes under different stress conditions in various yeast species; although, the mechanism regulating the antioxidant response stimulated by caffeine is not yet understood. To verify the role played by different TFs in response to caffeine, cells of the P01a strain of *Y. lipolytica* yeast were subjected to different types of stress (oxidative, thermal, osmotic, caffeine exposure), and finally, the expression pattern of the genes encoding the mentioned TFs was analyzed.

The results obtained show no differences in the expression of any of the genes (one-way ANOVA test) in cells subjected to the different types of stress, compared to the expression of genes in the control group cells (cells cultured in YPD medium). These findings suggest that caffeine does not modify the expression pattern of the genes corresponding to the TFs (Yap1, Skn7, Msn2, and Msn4).

Something that should be mentioned is that, despite not having observed statistically significant differences in the level of gene expression, the expression levels of MSN2 and MSN4 were higher in the control treatment (YPD medium) than in the treatments with stress-inducing agents. It has been mentioned in the literature that YPD medium, containing 2% glucose, can induce nutritional stress in *Yarrowia lipolytica* cells. For this reason, it can be concluded that it was a methodological error to use YPD medium as the control group, and it is suggested that using a medium with a lower concentration of glucose or a minimal nutrient medium could be used as a control group for the purposes of analyzing what is proposed in this work.

## 6. INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) (radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ )), se generan tanto a partir de fuentes endógenas como exógenas. La activación de células inmunitarias, la inflamación, la isquemia, la infección, el cáncer, el ejercicio excesivo, el estrés mental y el envejecimiento son responsables de la producción endógena de radicales libres. Por otra parte, la producción por vía exógena de radicales libres de oxígeno ocurre como resultado de la exposición a contaminantes ambientales, metales pesados (cadmio, mercurio, plomo, hierro y arsénico), ciertos medicamentos (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina y bleomicina), solventes químicos, cocción (carne ahumada, aceite usado y grasa), humo de cigarrillo, alcohol y exposición a radiación (Pizzino *et al.*, 2017). En concentraciones bajas, las ROS son necesarias, por ejemplo, para la respuesta normal de cicatrización de heridas ya que actúan como mensajeros secundarios de muchos inmunocitos y células no linfoides, que participan en el proceso de reparación de tejidos. También, las ROS también tienen la capacidad de regular la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) en el lugar de la herida y la perfusión óptima de sangre en el área de cicatrización de la herida (Dunnill *et al.*, 2017). Sin embargo, si se presentan en exceso, las ROS dan lugar a un fenómeno conocido como estrés oxidativo (EOx); proceso que puede afectar negativamente a varias estructuras celulares, como membranas y a moléculas como lípidos, proteínas, lipoproteínas y ácido desoxirribonucleico

Las células poseen un sistema antioxidante conformado por proteínas especializadas como catalasas, superóxido reductasas y peroxidasas que les permite protegerse del EOx, que es consecuencia del exceso de ROS. Además de las enzimas antioxidantes, existen antioxidantes exógenos de origen animal o vegetal que pueden ser administrados a través de la dieta o suplementos nutricionales, por ejemplo, vitaminas, flavonoides, polifenoles, carotenoides y algunos compuestos alcaloides como la cafeína (Vivancos *et al.*, 2006; Pizzino *et al.*, 2017; Młynarska *et al.*, 2024).

La cafeína es una sustancia ampliamente consumida a nivel mundial y que está presente además del café, en otros productos tales como medicamentos y suplementos alimenticios. Experimentos en ratas han mostrado que esta sustancia puede tener un

efecto protector contra el daño por radiación u otros agentes oxidantes, debido a que aumenta la concentración y actividad de las enzimas antioxidantes (Kaczmarczyk-Sedlak *et al.*, 2017). En un estudio de Baldissera y col. (2019), utilizando *Oreochromis niloticus* (Tilapia del Nilo) como organismo modelo, se demostró que el uso del 8% de cafeína en la dieta pudo prevenir el aumento de los niveles hepáticos de ROS y la aparición de peroxidación de lípidos provocada por la hipoxia; los autores describen que este efecto puede estar mediado por efectos protectores de la cafeína sobre la actividad de la enzima xantina oxidasa.

En presencia de EOx, la cafeína es capaz de disminuir la cantidad de ROS ya que estimula la expresión de los genes de respuesta antioxidante (*SOD*, *CAT*, *GPX*), cuyos productos protegen a la célula manteniendo la homeostasis; se ha descrito que este proceso biológico se logra mediante la acción de factores de transcripción (FT) (proteínas encargadas de regular la expresión de genes) (Choi *et al.*, 2022).

En el presente trabajo, se analizó el patrón de expresión de los genes que codifican para algunos FT encargados de la respuesta a estrés en levaduras (*Yap1*, *Skn7*, *Msn2* y *Msn4*) con el objetivo de estudiar cuál de estos FT es el responsable de modular la respuesta antioxidante de *Yarrowia lipolytica* en presencia de cafeína.

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo nos indica que no existen diferencias significativas entre los niveles de expresión de los genes analizados en los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las células. Por lo tanto, bajo las condiciones experimentales utilizadas, se puede concluir que la cafeína no modifica el patrón de expresión de los FT analizados, lo cual sugiere que a) tal vez otro(s) FT sean los encargados de la regulación de la respuesta celular antioxidante a la cafeína, b) que las condiciones experimentales utilizadas no fueron óptimas para encontrar diferencias entre los niveles de expresión de los genes *YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4*.

## 7. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El EOx se refiere a una condición originada como consecuencia de una desregulación en la producción de ROS. La presencia en exceso de estas moléculas está asociada con el deterioro de mecanismos celulares, propiciando el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (Teleanu *et al.*, 2022).

Para contrarrestar los efectos causados por cantidades excesivas de ROS, los organismos eucariotas cuentan con mecanismos enzimáticos. Las principales enzimas responsables de la respuesta celular antioxidante son: catalasas, superóxido dismutasas y peroxidases, las cuales están reguladas por FT que se encargan de regular la expresión de los genes que codifican para estas enzimas. Además de los mecanismos enzimáticos, las células cuentan con mecanismos no enzimáticos que les permiten mitigar el daño ocasionado por las ROS, entre estos se encuentran compuestos bioactivos que pueden ser obtenidos a través de la dieta (Cuéllar-Cruz *et al.*, 2014).

La cafeína (sustancia consumida diariamente por aproximadamente 80% de la población mundial) tiene la capacidad de alterar diversos procesos metabólicos cuya función es mantener la homeostasis en células eucariotas. En levaduras, se ha descrito que la cafeína perturba la integridad de la pared celular de estos organismos. En el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*, se ha demostrado que los efectos de la cafeína están relacionados con el crecimiento celular, la morfología, la reparación del ADN (ácido desoxirribonucleico) y la homeostasis intracelular del calcio. Además, debido a su similitud estructural con las bases nitrogenadas adenina, guanina y citosina, se sugiere que la cafeína podría afectar de manera negativa mecanismos relacionados con la replicación y reparación del ADN (Chung, 2021; Elhasi & Blomberg, 2023).

En un estudio previo realizado en el laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública se encontró que la cafeína es capaz de estimular la expresión de los genes que codifican para las enzimas del sistema de defensa antioxidante, en el organismo modelo *Yarrowia lipolytica* (Castillo, 2022). No obstante, aunque se menciona que la regulación del sistema de defensa antioxidante es a nivel transcripcional, se desconoce cuál es el FT (Yap1, Skn7, Msn2 o Msn4) responsable de dicha regulación.

## 8. ANTECEDENTES

### 8.1 Estrés oxidativo (EOx)

El EOx es una condición que se produce cuando existe un desbalance entre condiciones oxidantes y antioxidantes en un sistema biológico; tal condición es el resultado de un excesivo nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) o de un malfuncionamiento del sistema de defensa antioxidante (Singh *et al.*, 2019; He *et al.*, 2017).

#### 8.1.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS)

El término ROS abarca una variedad de moléculas que contienen oxígeno como los radicales superóxido, hidroxilo, oxígeno singlete y el peróxido de hidrógeno (Hardy *et al.*, 2018), cuyos efectos van desde eventos de señalización celular hasta ocasionar daño a diferentes biomoléculas. Las ROS son producidas continuamente como consecuencia del uso normal de oxígeno por parte de los organismos aerobios (Sies *et al.*, 2022; Bhattacharya, 2015). Las ROS juegan un papel importante en procesos que mantienen la homeostasis, por ejemplo: desarrollo de células neuronales, las cuales son esenciales para la plasticidad sináptica; en el sistema cardiovascular, protegen al miocardio de una falla repentina o malfuncionamiento; en el sistema músculo-esquelético son importantes para el desarrollo de células y para procesos de señalización celular, así como en procesos de reparación de fibras musculares. A pesar de desempeñar un papel importante en estos procesos, la sobreproducción de ROS (y como consecuencia la generación de estrés oxidativo), puede tener efectos indeseables, como son: carcinogénesis, apoptosis inducida por daño al ADN, proliferación de microorganismos patógenos, isquemia cardíaca, resistencia a la insulina, pérdida de masa muscular, desbalances hormonales y formación de placas de ateroma, por mencionar algunos (Yang & Lian, 2020).

A nivel intracelular, existen cuatro fuentes principales productoras de ROS: las mitocondrias, el retículo endoplásmico, los peroxisomas y la enzima NADPH oxidasa (Rendra *et al.*, 2019).

### 8.1.2 Antioxidantes

El término antioxidante se refiere a aquella sustancia o molécula que tiene la capacidad de retardar o inhibir el efecto de un compuesto oxidante; debido a esta función, los antioxidantes son críticos para mantener la homeostasis de un sistema biológico (Kumar *et al.*, 2017). Todos los organismos cuentan con enzimas que les permiten combatir el exceso de ROS. Tales enzimas, son parte de la denominada respuesta celular antioxidante, cuya función, en conjunto, es mantener la homeostasis celular. Por otra parte, a través de la dieta se pueden obtener moléculas antioxidantes tales como: vitaminas, flavonoides, polifenoles, carotenoides y algunos compuestos alcaloides como la cafeína (Kumar *et al.*, 2017; Młynarska *et al.*, 2024). Así, bajo condiciones fisiológicas normales, la producción de ROS es baja ya que el exceso de estas moléculas es eliminado de manera inmediata por los sistemas celulares antioxidantes (Batty *et al.*, 2022).

#### 8.1.2.1 Antioxidantes enzimáticos

Dentro de este contexto, se pueden identificar enzimas que tienen una gran habilidad de combatir las ROS debido a que tienen la capacidad de convertirlas a moléculas más simples (He *et al.*, 2017; Rendra *et al.*, 2019); entre estas enzimas se incluyen superóxido dismutasas (SOD), catalasas (CAT) y glutatión peroxidasas (GPX), cada una, actúa y modifica a un tipo específico de ROS (Rendra *et al.*, 2019).

##### 8.1.2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Las enzimas SOD representan la primera línea de defensa contra el daño causado por los niveles excesivos de ROS presentes en las células/o en los organismos vivos. Estas enzimas catalizan la reacción de conversión de radicales superóxido a oxígeno y peróxido de hidrógeno. La actividad de estas enzimas se ve condicionada por la presencia de un ion metálico el cual puede ser manganeso, hierro, níquel o cobre (Eleutherio *et al.*, 2021). En algunos estudios se ha sugerido que, el nivel de expresión de esta enzima (o su

actividad) se ven alterados en presencia de enfermedades como cáncer, trastornos neurodegenerativos y enfermedades vasculares (Wang *et al.*, 2018).

#### 8.1.2.1.2 Catalasas (CAT)

Las enzimas CAT pueden ser encontrada en todos los tejidos que requieren oxígeno; su función consiste en eliminar al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (generado por la actividad de SOD), convirtiéndolo en  $H_2O$  (agua) y  $O_2$  molecular. De manera similar a las SOD, las CAT también requiere de un cofactor para lograr su función, el cual usualmente es hierro o manganeso (Rendra *et al.*, 2019; Teleanu *et al.*, 2022). Se ha descrito que, en el cuerpo humano, la mayor actividad de esta enzima parece ocurrir en el hígado y los eritrocitos (Aslani & Ghobadi, 2016).

#### 8.1.2.1.3 Glutación peroxidasa (GPX)

Las GPX catalizan una reacción entre  $H_2O_2$  e hidroperóxido para formar agua mediante la oxidación del glutati3n reducido (GSH) a glutati3n disulfuro (GSSH). El sistema GPX incluye a las enzimas glutati3n peroxidasa, glutati3n reductasa, los cofactores monom3ricos glutati3n (GPH) y nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato (NADPH) reducido (Bhattacharya, 2015).

#### 8.1.2.2 Antioxidantes no enzimáticos

Adem3s del sistema de defensa antioxidante mediado por enzimas, los organismos superiores (en la escala evolutiva –mamíferos-) pueden hacer uso de los antioxidantes no enzimáticos, los cuales comprenden a las vitaminas A, C y E (Chaudhary *et al.* 2023), compuestos fen3licos, glutati3n, algunos iones y otros compuestos presentes en la dieta (Eleutherio *et al.*, 2018).

##### 8.1.2.2.1 Vitaminas (A, C y E)

La vitamina A o retinol es un carotenoide producido en el hígado y resultado de la descomposici3n del  $\beta$  caroteno que tiene la capacidad de unirse a los radicales peroxilo antes de que promuevan la peroxidaci3n lipídica (He *et al.* 2017).

La vitamina C tiene la capacidad de eliminar ROS ya que suministra electrones a radicales libres como superóxidos y radicales hidroxilo, reduciendo así su reactividad y daño potencial; además de servir como cofactor de algunas enzimas, ayudando al metabolismo del ácido fólico, la tirosina y el triptófano además de interactuar con el glutatión para mantener la forma reducida de tocoferol (Kaltsas, 2023).

La vitamina E tiene una gran capacidad para eliminar radicales libres *in vivo*. Cuando la vitamina E elimina los radicales peroxilo, los convierte en radicales de vitamina E, que pueden oxidarse aún más en  $\alpha$ -tocoferil quinona o reducirse con vitamina C u otros compuestos reductores para regenerar la vitamina E (Niki, 2015).

#### 8.1.2.2.2 Glutatión

El glutatión es un tripéptido (ácido glutámico, cisteína y glicina) que tiene una función importante en procesos de detoxificación de compuestos endógenos y exógenos, pudiendo encontrarse en muchos compartimentos celulares como citosol, retículo endoplásmico, mitocondria y vacuolas. Este antioxidante ejerce su función a través de la interacción con enzimas como glutatión peroxidasa y glutatión reductasa. En humanos, los niveles subóptimos de glutatión se han relacionado a trastornos neurodegenerativos y a enfermedades como cáncer (Adeoye *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2020).

#### 8.1.2.2.3 Minerales (selenio, zinc, manganeso)

Algunos minerales como el selenio pueden servir como agentes de protección contra algunas enfermedades.

El selenio protege el endotelio vascular y al ADN; mientras que la deficiencia de selenio puede provocar deterioro de las funciones inmunes que resulta en la incapacidad de neutrófilos y macrófagos fagocíticos para combatir antígenos (Xiao *et al.*, 2021; Tinggi, 2008).

El zinc es utilizado como cofactor de más de 2000 factores de transcripción (FT) y más de 300 enzimas que regulan la proliferación y diferenciación celular, y procesos metabólicos (Luan *et al.*, 2023).



El manganeso tiene dos roles fundamentales en los sistemas biológicos: a) remover ROS, mediante la formación de complejos no protéicos (fosfatos, carbonatos, lactatos) y, b) servir como cofactor de metaloenzimas que catalizan importantes reacciones para la homeostasis celular (Thines *et al.*, 2019).

#### 8.1.2.2.4 Compuestos bioactivos

Como compuestos bioactivos, se consideran aquellos compuestos presentes en la dieta que tienen la capacidad de promover la buena salud; dentro de éstos, se encuentran compuestos con actividad antioxidante como los carotenoides y los polifenoles.

Los carotenoides son moléculas lipofílicas con tendencia a acumularse en la membrana o en las lipoproteínas y actúan como captadores de oxígeno singlete y otras ROS. Se ha descrito que el  $\beta$ -caroteno puede disminuir el efecto del oxígeno singlete y el radical peroxilo. Las frutas y verduras de colores son la principal fuente de carotenoides en la dieta humana, siendo predominante la presencia de  $\beta$ -caroteno en las zanahorias, el camote, el pimiento y las verduras de hojas verdes (Khan *et al.*, 2019; Saini *et al.*, 2022). En los últimos años, se ha realizado exhaustiva investigación con el propósito de comprobar los efectos positivos del  $\beta$ -caroteno en la salud (Eleutherio *et al.*, 2018).

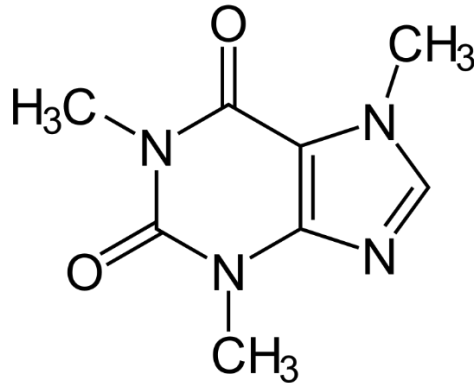
Los polifenoles son los antioxidantes que están presentes en mayor proporción en la dieta y pueden encontrarse en diferentes alimentos (frutos rojos, frutas cítricas, leguminosas, vegetales, café, té, etc.). Los polifenoles pueden ser clasificados en diferentes categorías: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos, de los cuales, se ha descrito que los flavonoides tienen la capacidad de inhibir la formación de radicales libres (Aslani & Ghobadi, 2016).

## 8.2 Cafeína

Entre los componentes de la dieta que funcionan como compuestos bioactivos, se puede mencionar a la cafeína, ya que existen estudios donde se sugiere que este compuesto es un antioxidante y radioprotector contra la vía óxica del daño por radiación; efectos que se han demostrado en una amplia gama de células y organismos (Azam *et al.*, 2003).

### 8.2.1 Estructura química de la cafeína

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina), es un compuesto orgánico heterocíclico con una base purina que pertenece al grupo de las xantinas y su estructura está relacionada a otras moléculas que también pertenecen a este grupo como teobromina, teofilina y paraxantina. Algunas características de la cafeína es que es una molécula moderadamente lipofílica, lo cual le permite atravesar barreras biológicas (Faudone *et al.*, 2021; Reddy, *et al.*, 2024).



**Fig. 1** Estructura química de la cafeína

### 8.2.2 Consumo de cafeína

La cafeína es la sustancia psico-estimulante más consumida a nivel mundial y se estima que forma parte de la dieta de más del 80% de la población. Se sugiere que alrededor del siglo XV, se empezó a tener noción acerca de los efectos de esta molécula sobre el sistema nervioso, hecho que popularizó el consumo y comercialización de los granos de café (Willson, 2018).

Además de ser una sustancia constituyente del café, la cafeína puede ser encontrada en otras bebidas como té, chocolate y bebidas de cola, medicamentos de venta libre, bebidas energéticas, suplementos nutricionales, cosméticos y medicamentos (Ruta & Farcasanu, 2020; Ogunwole *et al.*, 2024).

Se ha descrito que el consumo de cantidades moderadas de cafeína ( $\leq 400$  mg por día en adultos sanos) es seguro, observándose efectos benéficos; a esta concentración la

cafeína aumenta el estado de alerta y la concentración mental. Sin embargo, se debe mencionar que la cafeína no es un compuesto inocuo y sus efectos son dosis-dependientes; incluso puede causar daño fisiológico si se consume en exceso, ya que a dosis mayores de 500 mg/día se han observado efectos como irritabilidad, náuseas, temblores, mareos e insomnio (Willson, 2018).

### 8.2.3 Metabolismo de la cafeína

Se estima que, tras 45 minutos después de su ingestión, la cafeína tiene una biodisponibilidad del 100%, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre 15 y 120 minutos después de la ingestión oral (US Institute of Medicine, 2001). En el hígado, la enzima CYP1A2, perteneciente a la familia citocromo P450, transforma la cafeína a paraxantina (~85%), teobromina (~10%) y teofilina (< 5%) y se ha descrito que debido a esta interacción cafeína-enzima, la cafeína puede interferir con fármacos que son metabolizados por CYP1A2; por ejemplo: antidepresivos, antipsicóticos y fármacos cardiovasculares (Faudone *et al.*, 2021).

### 8.2.4 Efectos fisiológicos de la cafeína en el ser humano

La acción de la cafeína en humanos involucra tres mecanismos fundamentales: antagonismo de receptores de adenosina, inhibición de fosfodiesterasas, movilización intracelular de calcio (Elhasi & Blomberg, 2023).

El antagonismo de los receptores de adenosina es el mecanismo de acción más importante que ejerce la cafeína. La adenosina se encarga de regular diferentes mecanismos fisiológicos por medio de la modificación de la concentración del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). La estructura química de la cafeína es similar a la de la adenosina, característica que le permite unirse a los receptores de adenosina e inhibir su efecto, disminuyendo así la estimulación de los receptores por acción de la adenosina, lo cual resulta en el aumento en el estado de vigilia.

El efecto de la cafeína sobre la inhibición de fosfodiesterasas se observa cuando se presentan altas concentraciones de esta sustancia (100-1000  $\mu\text{M}$ ); esto tiene como consecuencia una acumulación de AMPc, que contribuye a la activación de lipasas en el tejido adiposo, acción necesaria para que se produzca la lipólisis, promoviendo así, la liberación de ácidos grasos y glicerol.

La movilización de calcio solamente ocurre bajo concentraciones muy altas de cafeína (>10 mM) ocasionando una disminución en la acumulación intracelular de calcio; este mecanismo puede afectar a la neurotransmisión ya que este proceso es dependiente del ingreso de calcio en las terminaciones nerviosas. En los músculos, la cafeína disminuye la toma y almacenamiento de calcio (0.1-1 mM) por parte del retículo sarcoplásmico, lo cual puede aumentar la fuerza y la resistencia de músculo esquelético y cardiaco (Bakker *et al.*, 2010; Reddy *et al.*, 2024).

#### 8.2.5 La cafeína como molécula antioxidante

El efecto antioxidante de la cafeína depende de la dosis y el tiempo de exposición. Como antioxidante, la cafeína actúa eliminando las ROS, quelando iones metálicos y mejorando el sistema de defensa antioxidante del organismo. En un estudio, se exploró la capacidad de la cafeína para quelar metales observando cómo interactuaba con los iones de cobre; los resultados sugieren que la cafeína es un eficiente agente quelante, reduciendo el daño oxidativo y los efectos prooxidantes de estos iones (Utomo, 2008).

En un estudio realizado por Choi y cols. (2010) se investigó el efecto de la cafeína sobre la actividad de enzimas antioxidantes, incluidas la superóxido dismutasa y la catalasa; los resultados de la investigación demostraron que el tratamiento con cafeína aumentó significativamente los niveles de actividad de estas enzimas en ratas entrenadas físicamente, mejorando la capacidad natural del organismo para combatir el EOX, reduciendo también los niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL).

### 8.3 Uso de organismos modelo para estudiar procesos biológicos

Las levaduras (organismos unicelulares eucariotas) han demostrado ser un modelo experimental útil para el estudio de procesos celulares que ocurren en los humanos, contribuyendo así a un mejor entendimiento de los procesos fisiopatológicos (Laurent *et al.*, 2016; Wangler *et al.*, 2017).

Los primeros organismos eucariotas en tener su genoma secuenciado fueron las levaduras; los procesos de estos organismos unicelulares (ciclo celular, traducción y transcripción y metabolismo de estructuras citoesqueléticas), son esencialmente los mismos que en otros organismos eucariotas, es decir, los diferentes elementos que participan en dichos procesos se encuentran perfectamente conservados entre organismos eucariotas simples (como levaduras) y complejos (como los mamíferos –los humanos-). Entre las principales ventajas de utilizar a las levaduras como organismos modelo es que tienen requerimientos nutricionales simples, su división celular ocurre de manera rápida (cada 1.5 - 2 h) y su cultivo y mantenimiento no es caro (Smith & Snyder, 2006).

#### 8.3.1 Efectos de la cafeína utilizando levaduras como modelo de estudio

En un estudio de Czachor y cols. (2020), para investigar los efectos del café sobre el envejecimiento, se utilizó la levadura *S. cerevisiae* como organismo modelo; para este estudio, se utilizaron células mutantes que carecían de los genes *SOD1*, *SOD2* y *RAD52*. Las enzimas codificadas por estos genes (superóxido dismutasas *SOD1* citosólica o *SOD2* mitocondrial) participan en la desintoxicación del radical anión superóxido en la célula, mientras que la proteína codificada por el gen *RAD52* participa en la reparación de roturas de doble cadena del ADN y en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. Entre los hallazgos más destacables, se encontró que casi todas las cepas analizadas tuvieron una tasa de crecimiento reducida, especialmente en el caso de la cepa parental y las cepas mutantes *sod1* $\Delta$  y *rad52* $\Delta$ . Las infusiones de café de la variedad *Coffea arabica* (Arábica) inhibieron en mayor magnitud el crecimiento de las cepas parental y *sod1* $\Delta$ , mientras que en *rad52* $\Delta$ , la variedad *Coffea canephora* (Robusta) tuvo un mayor

impacto en reducir la tasa de crecimiento. En las células mutantes (*sod2Δ*), no se observó un efecto destacable del café sobre el crecimiento. Los autores describen además que las infusiones de café retrasaron significativamente el envejecimiento de todas las cepas de levadura utilizadas en este estudio. Las infusiones de café Arábica tuvieron un mayor efecto inhibitorio del envejecimiento en las cepas parental, *sod1Δ* y *sod2Δ*, mientras que la variedad Robusta tuvo un efecto anti-envejecimiento más fuerte en la cepa *rad52Δ*.

Además de *S. cerevisiae*, otra levadura ampliamente utilizada como organismo modelo es *Yarrowia lipolytica*, entre cuyas principales características que le confieren estos beneficios se pueden mencionar: que tiene requisitos nutricionales relativamente bajos, muestra un potencial de crecimiento muy alto, su cultivo es independiente de las condiciones geográficas y climáticas, su manipulación es fácil y su cultivo no representa un alto costo (Jach & Malm, 2022; Castillo, 2022).

En trabajos previos realizados en el laboratorio de Proteómica del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP), se ha demostrado que la cafeína puede inhibir el crecimiento celular en *Yarrowia lipolytica* (Sifuentes, 2014), lo cual sugiere un efecto citotóxico (Quiñones-González *et al.*, 2019). Además, se ha descrito que la cafeína modifica el patrón de expresión de los genes (*CAT*, *SOD* y *GPX*) cuyos productos protéicos están involucrados en la respuesta antioxidante (Castillo, 2022).

#### 8.4 Factores de transcripción (FT)

La transcripción es el proceso que consiste en generar ARNm (ácido ribonucleico mensajero) usando como base la información genética del ADN (genes), proceso que posteriormente concluirá con la síntesis de proteínas. Este proceso (transcripción) es regulado por proteínas que se unen a secuencias específicas de ADN y que reciben el nombre de factores de transcripción (De Jonge *et al.*, 2022).

Los FT, son considerados una red regulatoria de la expresión de genes, la cual es fundamental para distintos procesos biológicos y actúan mediante la unión a secuencias regulatorias de ADN, reclutando ARN polimerasa y diversos cofactores, para iniciar el proceso de transcripción (Ulasov *et al.*, 2018). Los FT han desarrollado mecanismos de selectividad para unirse a elementos regulatorios específicos del ADN, con los cuales

exista alta afinidad (Mazzocca *et al.*, 2021). La regulación transcripcional ocurre en dos niveles interconectados: el primero involucra factores de transcripción y el aparato de transcripción, y el segundo involucra la cromatina y sus reguladores (Lee & Young, 2013).

En humanos, muchas enfermedades y síndromes están asociados con mutaciones en regiones reguladoras, cofactores, reguladores de la cromatina, ARN no codificantes y FTs. Se ha descrito que tales mutaciones contribuyen al desarrollo de enfermedades como cáncer, autoinmunidad, trastornos neurológicos, diabetes, enfermedades cardiovasculares y obesidad, entre otras. Cáncer: la mayoría de las células tumorales dependen del FT c-Myc para su crecimiento y proliferación. *MYC* es el oncogén amplificado con mayor frecuencia (la amplificación genética tiene lugar cuando se generan copias adicionales, en este caso, del gen *MYC* en células cancerosas, lo que provoca un aumento en la producción de su proteína correspondiente, el FT c-Myc) y su sobreexpresión se asocia con agresión tumoral y mal pronóstico clínico; autoinmunidad: las mutaciones en la proteína reguladora autoinmune (AIRE) causan el síndrome de poliendocrinopatía autoinmune tipo I; trastornos neurológicos: las mutaciones en *MED23* (el gen *MED23* codifica una subunidad del complejo mediador, un gran complejo multiproteico que es crucial en la regulación de la transcripción de genes por la ARN polimerasa II) alteran la interacción entre los FT unidos al potenciador y el mediador, lo que lleva a una desregulación transcripcional de genes tempranos inmediatos que responden a mitógenos y que afectan el desarrollo y la plasticidad del cerebro (mutaciones en *MED23* pueden estar asociadas con deficiencias en el desarrollo neurológico, afectando la función cognitiva y el comportamiento); diabetes: Los programas de expresión génica de las células pancreáticas parecen estar controlados por un pequeño conjunto de FTs clave, incluidos HNF1  $\alpha$ , HNF1  $\beta$ , HNF4  $\alpha$ , PDX1 y NEUROD1, algunos de los cuales contribuyen a la actividad de los circuitos autorreguladores interconectados de estas células. Por otra parte, las mutaciones en cualquiera de estos factores pueden dar lugar a diversas formas de diabetes juvenil de inicio en la madurez (MODY) (Lee & Young, 2013).

## 8.4.1 Principales FT asociados a estrés, descritos en levaduras

### 8.4.1.1 Función de Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4

En diferentes especies de hongos y levaduras, se ha descrito que el FT Yap1 se activa bajo condiciones de EOX, como la exposición a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, regulando la transcripción de genes antioxidantes (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2019; Ruta *et al.*, 2020). Yap1 también se hace presente ante una excesiva acumulación de ROS por la presencia de metales. Una vez activado, el FT Yap1 se desplaza del citoplasma al núcleo, donde regula la expresión del gen *SOD1* (Eleutherio *et al.*, 2021).

El FT Skn7 ha sido relacionado con diferentes procesos celulares y es clave en bacterias, levaduras, hongos y plantas ya que confiere a estos organismos capacidad de adaptación ante diferentes factores ambientales que generan estrés, regulando principalmente condiciones de estrés osmótico y oxidativo (Basso *et al.*, 2017; Gómez-Pastor *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018).

Los FT Msn2 y Msn4 responden a una variedad de condiciones capaces de desencadenar diferentes tipos de estrés en la célula. Estas condiciones incluyen estrés oxidativo, choque osmótico, estrés nutricional (falta de glucosa), altas concentraciones de etanol y cambios de temperatura. Se ha propuesto que la sobreexpresión de estos FT podría aumentar la resistencia a diferentes tipos de estrés en las células de *S. cerevisiae* (Mat Nanyan & Takagi, 2020; Eleutherio *et al.*, 2021).



## 9. JUSTIFICACIÓN

El EOX es una condición fisiológica caracterizada por un desequilibrio entre la producción de ROS (en exceso) y la capacidad de las células para combatirlas. En humanos, esta condición está implicada en la progresión de enfermedades como el cáncer, Alzheimer, Parkinson y, en general, todas aquellas patologías caracterizadas por procesos inflamatorios. A pesar de que las ROS participan en procesos biológicos (son una parte integral de la función celular normal y del sistema de defensa del hospedador contra invasores; además de actuar como moléculas de señalización bajo concentraciones fisiológicas) (Reddy, 2023). La acumulación de ROS, conduce a daño celular mediado por la interacción de éstas con las diferentes biomoléculas, generando cambios en su estructura y en su funcionamiento (Hong *et al.*, 2024). Además, se ha descrito que una mayor generación de ROS, también puede dar como resultado, la activación de varios FT inducidos por diferentes tipos de estrés y la producción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Priya Dharsini *et al.*, 2020).

El mecanismo por el cual los FT regulan la expresión de sus genes diana es mediante el reconocimiento de secuencias promotoras de ADN cerca del sitio de inicio de la transcripción o elementos potenciadores de ADN. Se ha descrito que los procesos de desarrollo y diferenciación en los sistemas eucariotas están regulados por grupos de FT que se encuentran en constante cambio y que dirigen los programas transcripcionales específicos de cada célula (Papavassiliou & Papavassiliou, 2016). Debido a la alta especificidad de los FT, éstos se han propuesto como blancos/dianas de gran importancia en la terapia dirigida a enfermedades (He *et al.*, 2023).

Se ha descrito que un mal funcionamiento de los FT puede propiciar el desarrollo de enfermedades; algunos autores han documentado que las mutaciones, ya sea en los genes que codifican para los FT o en las secuencias a las que se unen, están implicadas en el desarrollo de patologías (ejemplo: diabetes, cáncer). Por otra parte, la sobreexpresión de FT oncogénicos puede alterar el circuito autorregulador central de la célula propiciando tumorigénesis (Lee & Young, 2013; Rai *et al.*, 2021).

Los mecanismos celulares que regulan la respuesta celular ante el EOx no han sido completamente descritos; se ha observado que en las diferentes especies la transcripción de genes de la respuesta antioxidante está regulada por diferentes FT; además, dicha respuesta es específica para los diferentes agentes y tipos de estrés inducidos. (Eleutherio *et al.*, 2018). Las levaduras y los humanos comparten algunas vías funcionales que controlan aspectos clave de la biología de las células eucariotas como el ciclo celular, el metabolismo, apoptosis, plegamiento de proteínas, respuesta celular antioxidante y muchas vías de señalización, como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía TOR (*Target of Rapamycin*) (Mohammadi *et al.*, 2015). Debido a las características particulares de las levaduras (lo que les ha permitido ser usadas como organismo modelo), las hace ideales para profundizar en la comprensión de los mecanismos responsable se modular la respuesta antioxidante y, por lo tanto, un modelo celular adecuado para identificar agentes y/o condiciones tanto prooxidantes como antioxidantes.

Los antioxidantes son las sustancias encargadas de combatir los efectos nocivos de las ROS, y algunos de ellos pueden obtenerse a través de la dieta. La cafeína es una de las sustancias más consumidas a nivel mundial. Por lo tanto, es necesario investigar los efectos de su ingesta sobre diferentes actividades biológicas. En diversos estudios se ha encontrado que la cafeína tiene efecto antioxidante ya que se dirige a la proteína SIRT3 para mejorar la actividad de SOD2 y proteger las células de la piel del EOx inducido por radiación UV. Por tanto, la cafeína, como pequeña molécula activadora de SIRT3, podría ser un potencial agente protector contra la radiación UV (Xu *et al.*, 2020).

El estudio de la respuesta celular antioxidante (como mecanismo antagónico al EOx es de gran importancia ya que el equilibrio entre la producción de ROS y los mecanismos antioxidantes es indispensable para la homeostasis celular y el correcto funcionamiento biológico.

Analizar la expresión de los genes que codifican para los FT *YAP1*, *SKN7*, *MSN2* Y *MSN4* en células de *Yarrowia lipolytica* sometidas a diferentes tipos de estrés permitirá determinar cuál de los FT considerados es el responsable de regular la expresión de los

genes de respuesta antioxidante (*CAT*, *SOD* Y *GPX*), en respuesta a la presencia de cafeína.

## 10. HIPÓTESIS

El efecto de la cafeína sobre la expresión de genes implicados en la respuesta celular antioxidante es regulado por la acción de los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 o Msn4, en células de *Yarrowia lipolytica*.

## 11. OBJETIVOS

### 11.1 Objetivo general

Analizar cuál(es) factor(es) de transcripción regula(n) la expresión de los genes de la respuesta antioxidante estimulada por cafeína, utilizando como organismo modelo células de *Yarrowia lipolytica*.

### 11.2 Objetivos específicos

1. Diseñar oligonucleótidos específicos para los genes que codifican para los factores de transcripción Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 y estandarizar las condiciones experimentales para su uso.
2. Determinar los cambios en la expresión de los genes que codifican para los FT Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 en células bajo diferentes condiciones de estrés (oxidativo, osmótico, térmico y presencia de cafeína).
3. Evaluar la participación de los diferentes FT en la regulación de la respuesta antioxidante en células de *Y. lipolytica* sometidas a diferentes tipos de estrés.

## 12. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

En la sección de métodos se hace una descripción detallada de los puntos que a continuación se presentan en el esquema (Fig. 2).

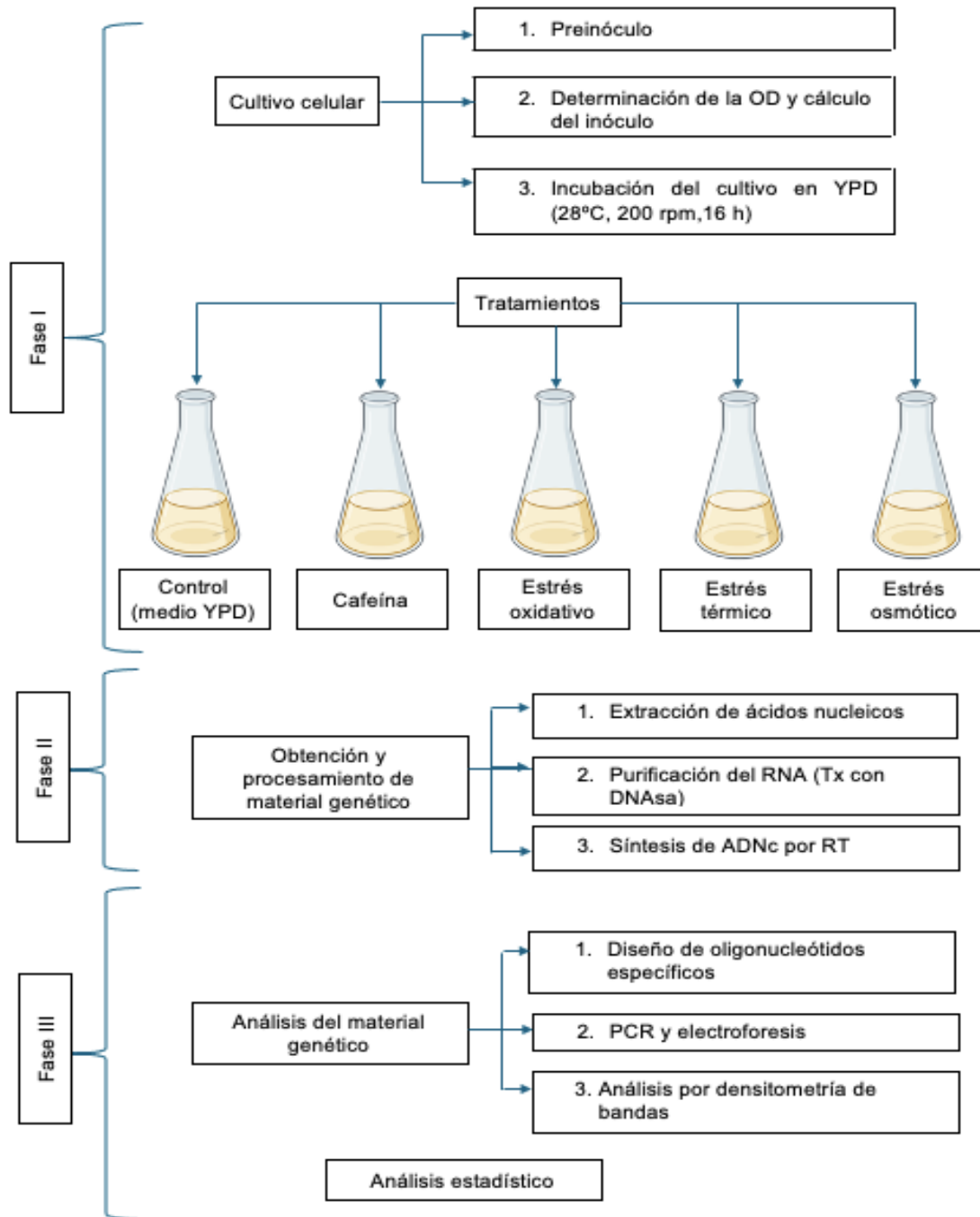


Fig. 2 Estrategia general de trabajo

## 13. MÉTODOS

### 13.1 Diseño del estudio

El presente estudio fue de tipo experimental y analítico. Para analizar la expresión de los genes correspondientes a los factores de transcripción se utilizaron cultivos en medio YPD líquido con células sometidas a diferentes tratamientos: cafeína, peróxido de hidrógeno, estrés térmico y estrés osmótico.

El proceso experimental se llevó a cabo 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).

### 13.2 Procedimiento experimental

#### 13.2.1 Cultivos celulares y preparación de medios de cultivo

Las células de la cepa P01A del organismo modelo *Yarrowia lipolytica*, fueron cultivadas en medio YPD (*yeast extract, peptone, dextrose*) que consiste en 1% extracto de levadura, 2% peptona de caseína y 2% de glucosa). El medio de cultivo se esterilizó en autoclave por calor húmedo (121°C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión, durante 15 min) y se almacenó a temperatura ambiente para su uso.

##### 13.2.1.1 Preparación y ajuste del preinóculo según la OD

Para preparar el preinóculo se utilizaron cultivos en medio YPD sólido (en placas Petri) de células de la cepa P01a. Bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar (SG 403, SterilGARD III Advance), se inoculó una colonia en un tubo cónico de polipropileno de 50 mL que contenía 30 mL de medio YPD líquido y posteriormente se incubó a 28°C con agitación (200 rpm) por 18-20 h (Lab Companion).

La cantidad de materia biológica para el inóculo se estandarizó mediante la determinación de la densidad óptica (OD) del preinóculo, para lo cual, se realizaron diluciones (1:10; 1:20; 1:50 y 1:100) del pre-cultivo, utilizando agua miliQ, en condiciones de esterilidad. La

lectura de la OD se realizó mediante espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro (UV- Visible Evolution 300, Thermo Scientific) a una longitud de onda de 600 nm.

La OD, para el posterior inóculo de los matraces, se ajustó a 0.2 utilizando la siguiente fórmula:

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

Donde:

- $V_i$ : Volumen inicial
- $C_f$ : Concentración final
- $V_f$ : Volumen final
- $C_i$ : Concentración inicial

Una vez que se determinó la cantidad de inóculo necesario, éste se agregó a un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 200 mL de medio YPD y se incubó a 28°C/200 rpm por 16 h. A partir de estas células, se procedió a la preparación de los diferentes tratamientos (ver 13.2.2).

### 13.2.2 Tratamientos

Para añadir las células a los diferentes matraces (correspondientes a los distintos tratamientos), se centrifugó el cultivo celular en tubos cónicos de polipropileno de 50 mL, a 5000 rpm/10 min (centrífuga Hermle Z 326 K) y el paquete celular se resuspendió en 15 mL de medio YPD líquido; posteriormente, a cada matraz (c/u correspondiente a los diferentes tratamientos) se le añadieron 3 mL de células resuspendidas en medio YPD.

#### 13.2.2.1 Grupo control

Consistió en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de medio YPD.

#### 13.2.2.2 Tratamiento con cafeína

Se preparó un matraz con 50 mL de medio YPD y se le añadieron 2.5 mL de una solución stock de cafeína con una concentración de 100 mM, para tener una concentración final de 5 mM de cafeína. Para preparar la solución stock de cafeína (100 mM) se pesaron 0.194 g de cafeína (Sigma-Aldrich) utilizando una balanza analítica (HR-250AZ) y se aforó a 10 mL utilizando agua miliQ. Posteriormente, se calentó a baño maría (60°C) para lograr una mezcla homogénea. Por último, la solución se esterilizó por filtración utilizando una jeringa hipodérmica y un filtro (MILLIPORE® SLGPR33RB 0.22  $\mu$ m tamaño del poro)

#### 13.2.2.3 Estrés térmico

Se preparó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio YPD y se incubó a 40°C, durante 15 min.

#### 13.2.2.4 Estrés osmótico

Se preparó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio YPD que tuviese una osmolaridad de 1500 mOsm. Como primer paso, se preparó una solución stock de cloruro de sodio (NaCl) diluyendo 9 g de NaCl en 200 mL de H<sub>2</sub>O desionizada para tener una solución con una osmolaridad total de 1500 mOsm. Posteriormente se preparó medio YPD 5X mezclando 2.5 g de extracto de levadura, 5 g de peptona de caseína y 5 g de dextrosa y se diluyeron en 50 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. Para la preparación del tratamiento, se mezclaron 40 mL de la solución stock de NaCl (1500 mOsm) y 10 mL del medio YPD (5X). Obteniéndose 50 mL de medio YPD (1500 mOsm).

#### 13.2.2.5 Estrés oxidativo

Se preparó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio YPD, al cual se le agregaron 14.22  $\mu$ L de una solución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con una pureza del 50% (Fermont Lab), con la finalidad de tener una concentración final de 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **De modo que, se contó con 5 grupos:**

- Grupo control
- Tratamiento con cafeína [5 mM]
- Estrés oxidativo [5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]
- Estrés térmico (40°C)
- Estrés osmótico [1500 mOsm]

Las células sometidas a los diferentes tratamientos (5 matraces) fueron incubadas por 15 min a 28°C y agitación (200 rpm).

#### 13.2.3 Obtención y procesamiento del material genético

Para la obtención del material genético, se hicieron paquetes celulares; para ello se tomaron 1.5 mL de cultivo correspondiente a cada uno de los tratamientos y se transfirieron a un tubo cónico (tipo Eppendorf) de 1.5 mL de capacidad; después, se sometieron a centrifugación por 3 min a 12000 rpm utilizando una microcentrífuga (Centrifuge 5415D, Eppendorf) para concentrar las células en el fondo del tubo y posteriormente poder decantar el sobrenadante. Este paso se repitió tres veces, lo que significa que se utilizaron 4.5 mL de medio de cultivo para obtener el paquete celular correspondiente.

##### 13.2.3.1 Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos (AN) se realizó utilizando el método descrito por Hoffman y Winston (1987), para lo cual los paquetes celulares permanecieron en cama de hielo molido todo el tiempo. El primer paso fue el rompimiento de la pared celular combinando un método mecánico (maceración con 300 µL de perlas de vidrio) y un método químico (utilizando 400 µL de buffer o solución de lisis que contiene sodio dodecil sulfato, sucrosa, cloruro de sodio, hidroximetil amino metano, ácido etilendiaminotetraacético y ácido clorhídrico). Posteriormente, se agregaron 400 µL de fenol-cloroformo (50:50) para separar la fase acuosa que contiene los AN, los tubos se



agitaron en vórtex, en 3 periodos, alternando 1 min en agitación y 1 min en hielo. Después, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min; la fase acuosa (aprox 400  $\mu$ L), fue transferida a un tubo de polipropileno nuevo con capacidad de 1.5 ml. Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar los AN. Las muestras se mezclaron por inversión y se incubaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se eliminó por decantación. Los AN contenidos en el tubo se lavaron con 500  $\mu$ L de etanol al 70% y se centrifugaron por 5 min a 12000 rpm para posteriormente eliminar el sobrenadante por decantación. Este proceso se realizó dos veces y los restos de etanol se eliminaron por absorción con micropipeta. Los tubos que contenían los AN se dejaron secando a temperatura ambiente durante 10 min. Los AN obtenidos se resuspendieron con 50  $\mu$ L de agua bidestilada y se cuantificaron (260 nm) utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop 2000 UV-Visible, Thermo Fisher Scientific). Las muestras (AN) se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 13.2.3.2 Aislamiento del ARN (eliminación del ADN por tratamiento con la enzima DNasa)

Después de haber obtenido los AN, el siguiente paso fue purificar, a partir de éstos el ARN; para ello se utilizó la enzima DNasa (BIOLINE) que permitió eliminar de la muestra de AN, todo residuo de ADN y solo conservar el ARN.

Como primer paso, se estandarizaron las condiciones experimentales de digestión enzimática. Se probaron diferentes marcas de enzimas DNasas (Bioline y Promega), diferentes cantidades de enzima (1, 2 y 3 Unidades enzimáticas) y diferentes tiempos de incubación (1 h, 1 1/2 h, 2 h). Para cada digestión, se utilizaron 1000 ng de AN totales, que se colocaron en un tubo cónico de polipropileno (200  $\mu$ L) y se mezclaron con 1  $\mu$ L de buffer de la enzima DNasa, 2  $\mu$ L de la enzima DNasa (1 U/ $\mu$ L) y 5  $\mu$ L de agua bidestilada estéril (ver tabla 1). Enseguida se agregaron, para cada muestra las cantidades y condiciones que se describen a continuación: muestra #1, se añadió 1 U enzimática (DNasa, Bioline) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 h, proceso que se llevó a cabo dos veces;

muestra #2, se añadió 1 U enzimática (enzima Bioline) y se incubó a 37°C por 1 h, proceso que se llevó a cabo tres veces; muestra #3, se añadieron 2 U enzimáticas (enzima Bioline) y se incubaron a 37°C por 2 h continuas. De manera similar, se realizó el análisis de la digestión con la enzima DNasa de la marca Promega; muestra #4 se añadió 1 U enzimática y se incubó a 37°C por 1 h, proceso que se llevó a cabo dos veces; muestra #5, se añadieron 2 U enzimáticas y se incubaron a 37°C por 2 h continuas y en la muestra #6 se añadió 1 U enzimática y se incubó a 37°C por 1 h, este proceso se repitió tres veces. En cada uno de los tratamientos, al terminar el tiempo de incubación, a cada muestra se le agregó 1 µL de EDTA (20 mM) y se incubó a 65°C por 15 minutos para detener la reacción enzimática. Después de los diferentes tratamientos con DNasa, las muestras se sometieron a reacciones de PCR para determinar la eficiencia de cada uno de los tratamientos. En este experimento, se incluyó una reacción de PCR con ADNg y primers del gen *ALG9*, como control positivo, y como control negativo, se usó una reacción de PCR, sin ADN.

**Tabla 1. Componentes para la digestión enzimática con DNAsa**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (µL)</b>
Muestra	500 ng/µL (2)
Buffer de la enzima	1
DNasa (1 U/µL)	2
Agua (milliQ, estéril)	5

El ARN obtenido (libre de DNA) se cuantificó (260nm) por espectrofotometría (NanoDrop 2000 UV-Visible, Thermo Fisher Scientific) y para corroborar la eficiencia del proceso enzimático (tratamiento con la DNasa), 1 µL de cada muestra (aprox 50-60 ng/µL de ARN) se sometió a una reacción de amplificación por PCR.

### 13.2.3.3 Síntesis de ADNc

Para obtener el ADN complementario (ADNc), se utilizó el sistema de transcripción reversa GoScript (PROMEGA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este proceso se llevó a cabo mediante dos reacciones; para la primera reacción (ver tabla 2), se mezclaron

en tubos de polipropileno; el ARN y el oligo dT. Esta reacción fue incubada a 70°C por 5 min y posteriormente se añadió el producto(s) de la reacción 2 (ver tabla 3).

**Tabla 2. Componentes para la reacción 1 de síntesis de ADNc**

Reactivo	Volumen (µL)
ARN (100 ng)	11
Oligo dT	1
	Vf: 12

El Vf de cada tubo no debe superar los 20 µL, de los cuales, no más de 11 µL deben provenir de ARN.

**Tabla 3. Componentes para la reacción 2 de síntesis de ADNc**

Reactivo	Volumen (µL)
Buffer de reacción 5X	4
Mezcla de dNTP's	1
Enzima Transcriptasa Reversa (200 U/µL)	1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2
	Vf: 8

Conforme a las instrucciones del fabricante, la mezcla de la reacción 2, se incubó a 25°C por 5 min, posteriormente a 42°C por 1 h y por último a 70°C por 15 min.

### 13.2.4 Análisis de la expresión de genes por RT-PCR

#### 13.2.4.1 Diseño de primers para los genes *YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4*

Las secuencias correspondientes a los genes *YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4* de *Y. lipolytica* se obtuvieron utilizando el software Yeabstract (yeabstract.com), considerando su homología con FT descritos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sobre las secuencias obtenidas, correspondientes a cada uno de los genes, se diseñaron primers

específicos (Forward y Reverse) y se comprobó que éstos cumplieran con condiciones necesarias como %GC (entre 40 y 60%), temperatura de alineamiento (que no hubiese más de 2°C de diferencia entre cada par de primers), que no formaran estructuras secundarias, utilizando herramientas tales como OligoAnalyzer (idt.com) y OligoCalc (biotools.edu). La especificidad de cada par de primers se determinó mediante PCR virtual (software Primer Blast: ncbi.gov). Finalmente, las condiciones experimentales para su uso se determinaron mediante reacciones de PCR con DNA genómico de la cepa P01a de *Y. lipolytica* probando diferentes temperaturas de alineamiento (56 - 60°C); diferente número de ciclos (22, 25 y 27) y diferentes cantidades de ADNg (50 - 500 ng).

#### 13.2.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El análisis de la expresión de genes se realizó por PCR semicuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia correspondiente a los genes: *YAP1*, *SKN7*, *MSN2*, *MSN4* y al gen constitutivo *ALG9*. El ADNc obtenido por RT (ver 13.2.3.3) se utilizó para la reacción de PCR en conjunto con los demás componentes necesarios para llevar a cabo la reacción (ver tabla 4). La mezcla se realizó en un tubo de polipropileno de 200 µL de capacidad colocados sobre una cama de hielo molido (4°C). Los tubos fueron previamente etiquetados conforme a 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.

**Tabla 4. Componentes para la reacción de PCR**

Reactivo	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	6.9
Buffer de reacción	2.5
Oligonucleótido F	1
Oligonucleótido R	1
Enzima (Taq polimerasa, 5 U/µL)	0.1
ADN molde (ADNc, 1000 ng/µL)	1
	Vf= 12.5

**Tabla 5. Condiciones usadas para las reacciones de PCR**

Etapa	Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de ciclos
1	Desnaturalización	95	5	1
2	Desnaturalización		60	1
	Alineamiento			
	Extensión	72		
3	Extensión final		10	1
4	Conservación	4	∞	-

#### 13.2.4.3 Análisis de productos de PCR: electroforesis en geles de agarosa

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para preparar los geles de agarosa, la solución de agarosa (2%) con buffer TAE (1X) se calentó utilizando una placa de calentamiento (PC420D, Corning Stirrer). Una vez disuelta la agarosa, 25 mL de ésta, se transfirieron a un tubo cónico de polipropileno con capacidad de 50 mL y se le agregaron 2 µL del colorante fluorescente Gel Red (Biotium); la mezcla se homogeneizó por inversión y se depositó en un molde con un peine de plástico para la formación de pocillos. Se dejó gelificar por 20 min y posteriormente en cada pocillo se cargaron 10 µL de producto de PCR correspondiente a cada una de las muestras analizadas mezclados con 2 µL de buffer de carga (0.25% azul de bromofenol y 40% de sucrosa). Para verificar que la banda única obtenida correspondiera con el tamaño de fragmento deseado, correspondiente a cada gen, se cargaron en el primer pocillo de cada gel 2 µL de marcador de talla molecular (Hyperladder IV, BIOLINE) mezclados con 2 µL de buffer de carga y 6 µL de buffer TAE 1X. El gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal (BioRad Sub-Cell 192) que contenía Buffer TAE 1X. Para la separación de las bandas correspondientes a los productos amplificados (electroforesis), se aplicó una corriente eléctrica de 20 Volts durante 5 min y 120 Volts durante 30 min, utilizando una fuente de poder (PowerPac™ 300; marca Bio-Rad).

#### 13.2.4.4 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 se obtuvieron por cuantificación de la intensidad de las bandas, utilizando el 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 *ALG9*.

### 13.3 Análisis

#### 13.3.1 Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico se utilizó el software SPSS V.22 aplicando pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y posteriormente, se utilizaron pruebas paramétricas (ANOVA) con post-hoc Games-Howell para comparación de medias. Para comparar los niveles de expresión de cada gen se consideró un intervalo de confianza del 95%.

#### 13.3.2 Consideraciones éticas

No aplican para efecto de la realización de este proyecto ya que las muestras que se utilizaron corresponden a células provenientes de la cepa P01a de la levadura *Yarrowia lipolytica*.

#### 13.3.3 Consideraciones de bioseguridad

La FDA considera a *Yarrowia lipolytica* como un organismo GRAS (*generally regarded as safe*), por lo que su manipulación no representa un riesgo para el operador. Sin embargo, a lo largo del desarrollo del proyecto, se tomaron en cuenta las condiciones de seguridad dispuestas en la Ley General de Salud (Título Cuarto, Capítulo Uno de la Ley General de Salud) relacionadas con la investigación en salud. Todos los materiales que entraron en contacto con reactivos considerados riesgosos (bromuro de etidio, fenol y cloroformo) fueron desechados en recipientes etiquetados para ser manejados como Residuos

Peligrosos (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002). Los restos de las muestras biológicas fueron esterilizados haciendo uso de la autoclave y colocados en recipientes específicos para este proceso, antes de ser desechados.

## 14. RESULTADOS

### 14.1 Estandarización de las condiciones de PCR

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se demostró que en células de *Y. lipolytica*, el gen *ALG9*, el cual codifica para la enzima (alpha-1,2-mannosyltransferase) que cataliza la transferencia de grupos manosa a oligosacáridos ligados a lípidos, puede ser utilizado como gen constitutivo para el análisis de expresión de genes (Miranda, 2016). En el presente trabajo, se utilizó este gen (*ALG9*) para normalizar los datos que representan los niveles de expresión de los genes, entre los diferentes experimentos.

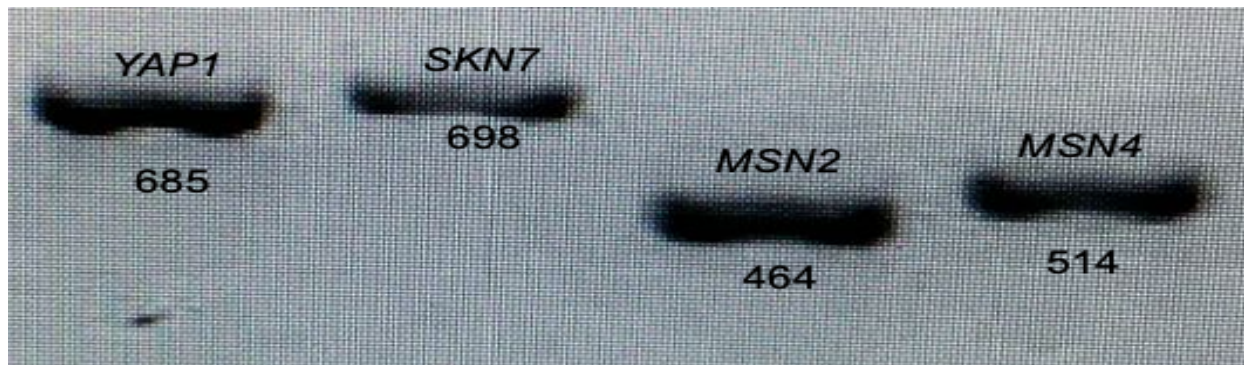
Sobre las secuencias de los genes que codifican para los diferentes FT analizados (*YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4*), se diseñaron oligonucleótidos específicos, utilizando herramientas bioinformáticas para estandarizar las condiciones experimentales de amplificación con los oligonucleótidos diseñados para los FT, se realizaron reacciones de PCR sobre ADN genómico (ADNg) de *Y. lipolytica* a 60°C, tomando en cuenta las condiciones utilizadas para el gen constitutivo *ALG9*, como se describe en la sección de material y métodos. Las características de los oligonucleótidos utilizados (secuencia, tamaño del fragmento amplificado y temperatura de alineamiento) determinadas experimentalmente, se muestran en la tabla 6.

En la figura 3 se muestran los productos de PCR obtenidos como producto de la amplificación de ADNg utilizando los oligonucleótidos diseñados, corroborando con ello su especificidad y eficiencia. Se observa una banda única de fragmento amplificado que corresponde a lo esperado (tabla 6).



**Tabla 6. Características de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR**

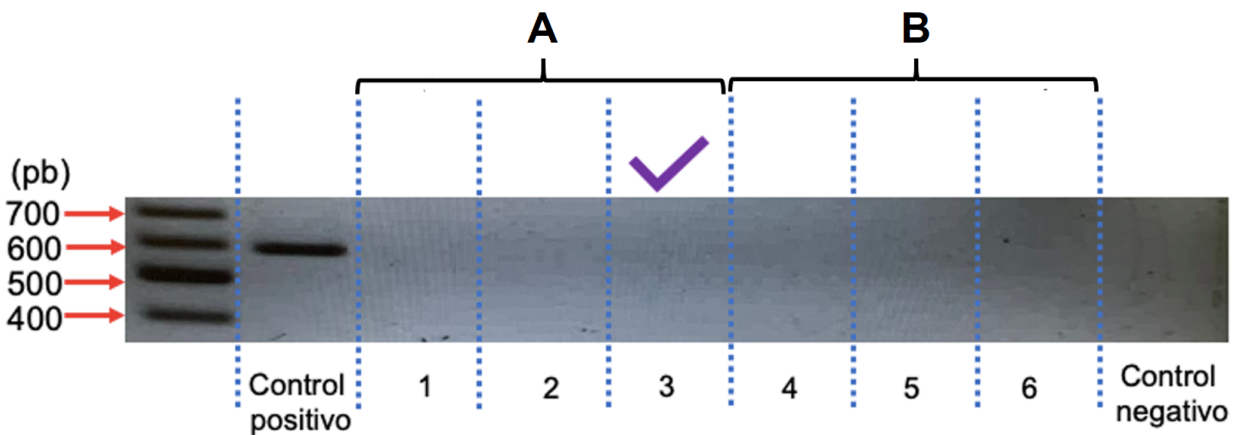
Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
ALG9-F	CCGGCGACTTTGCGATACTGTGCC	60	535
ALG9-R	CCAGCAACAGCAATGAGCACAAAGCC		
YAP1-F	CCGAAAGCCGAAACCACCATCC	60	685
YAP1-R	GGGAGATGCACTGGCTGTGGC		
SKN7-F	CCAGCTCAACAAGTACGACTTCC	60	698
SKN7-R	CCGACGCTATGAGAATTTTCTGACC		
MSN2-F	CCACACCCCATCCACCACACC	60	464
MSN2-R	CCACATCATCCTTCTCGTCGTCC		
MSN4-F	CTCTGTCTCCCGCCACTCC	60	514
MSN4-R	GGCGAGGGAGACATTGAAGC		



**Fig. 3 Electroforesis en gels de agarosa (2%) de productos de PCR de los genes con los diferentes primers diseñados.** Condiciones de PCR: 22 ciclos, 60°C (temp. de alineamiento), cantidad de ADNg: 500 ng; cantidad de cada primer: 1 µL de una dilución 90:10 de primers.

## 14.2 Aislamiento de ARN

Para la purificación del ARN (por eliminación del ADN), se probaron diferentes marcas de enzimas DNasas (Bioline y Promega), diferentes cantidades de enzima (1-2  $\mu$ L) y diferentes tiempos de incubación (1 h/1 1/2 h/2 h). Los productos resultantes de la digestión enzimática se sometieron a reacciones de PCR. La figura 4 representa la electroforesis (gel de agarosa al 2%) de los productos de las reacciones de PCR sobre las muestras sometidas a los diferentes tratamientos con DNasa; en ella se observa que en ninguna de las muestras se obtuvo producto amplificado, lo cual indica que el ADN genómico fue eliminado en su totalidad con los diferentes tratamientos utilizados. En este experimento, se incluyó una reacción de PCR con ADN<sub>g</sub> y primers del gen ALG9, como control positivo, y como control negativo, se usó una reacción de PCR, sin ADN.



**Fig. 4 Análisis por PCR de la eficiencia del tratamiento con la enzima DNasa.** Los carriles 1-6, corresponden a productos de reacciones de PCR, utilizando muestras de AN tratadas con DNasa, en las diferentes condiciones probadas; los carriles 1-3 (sección A) corresponden a muestras tratadas con enzima marca Bioline y los carriles 4-6 (sección B) corresponden a muestras tratadas con enzima marca Promega. Como control positivo se utilizaron 500 ng de ADN<sub>g</sub> y como control negativo, se agregó H<sub>2</sub>O, a la reacción de PCR. Todas las reacciones de PCR se realizaron utilizando primers específicos del gen ALG9 de *Y. lipolytica*.

### 14.3 Análisis de la expresión de los genes correspondientes a los FT

Con las muestras (ADNc) obtenidas de los diferentes cultivos celulares (ver sección 13.2.2) se realizaron las reacciones de PCR correspondientes (con los diferentes pares de primers). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa y los resultados obtenidos se sometieron a análisis por densitometría de bandas; el análisis estadístico permitió construir gráficas donde se observan los diferentes niveles de expresión de cada gen en los tratamientos utilizados. En la tabla 7, se presentan los valores numéricos correspondientes a los niveles de expresión de cada uno de los genes analizados.

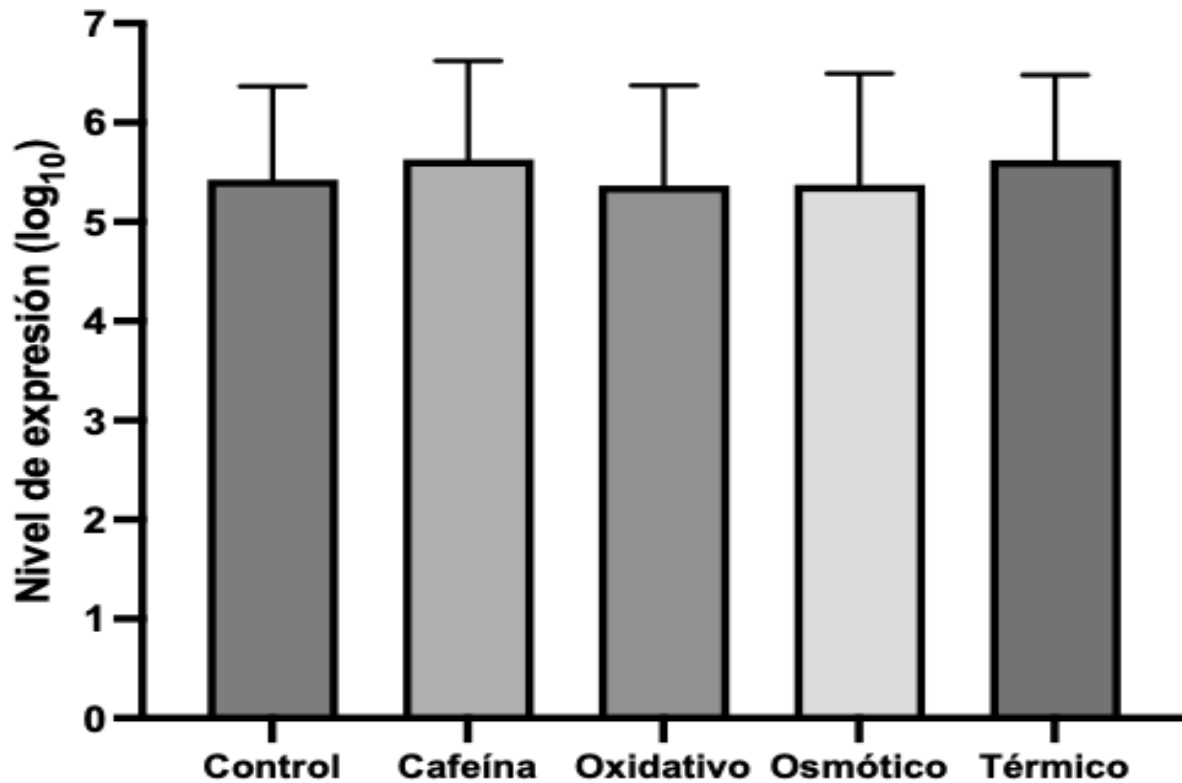
**Tabla 7. Niveles de expresión de los genes *YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4* en células sometidas a diferentes tipos de estrés.**

Gen	Control	Cafeína	E. Oxidativo	E. Osmótico	E. Térmico	$p$
<i>YAP1</i>	5.43 ± 0.93	5.63 ± 0.98	5.37 ± 1.00	5.37 ± 1.12	5.62 ± 0.85	0.995
<i>SKN7</i>	4.63 ± 0.76	4.76 ± 1.15	4.57 ± 1.05	4.95 ± 1.19	4.83 ± 1.12	0.985
<i>MSN2</i>	5.24 ± 0.66	5.20 ± 0.92	4.70 ± 0.83	4.96 ± 1.08	5.19 ± 0.48	0.868
<i>MSN4</i>	5.26 ± 0.76	5.07 ± 0.65	4.75 ± 0.42	5.11 ± 0.51	4.94 ± 0.59	0.806

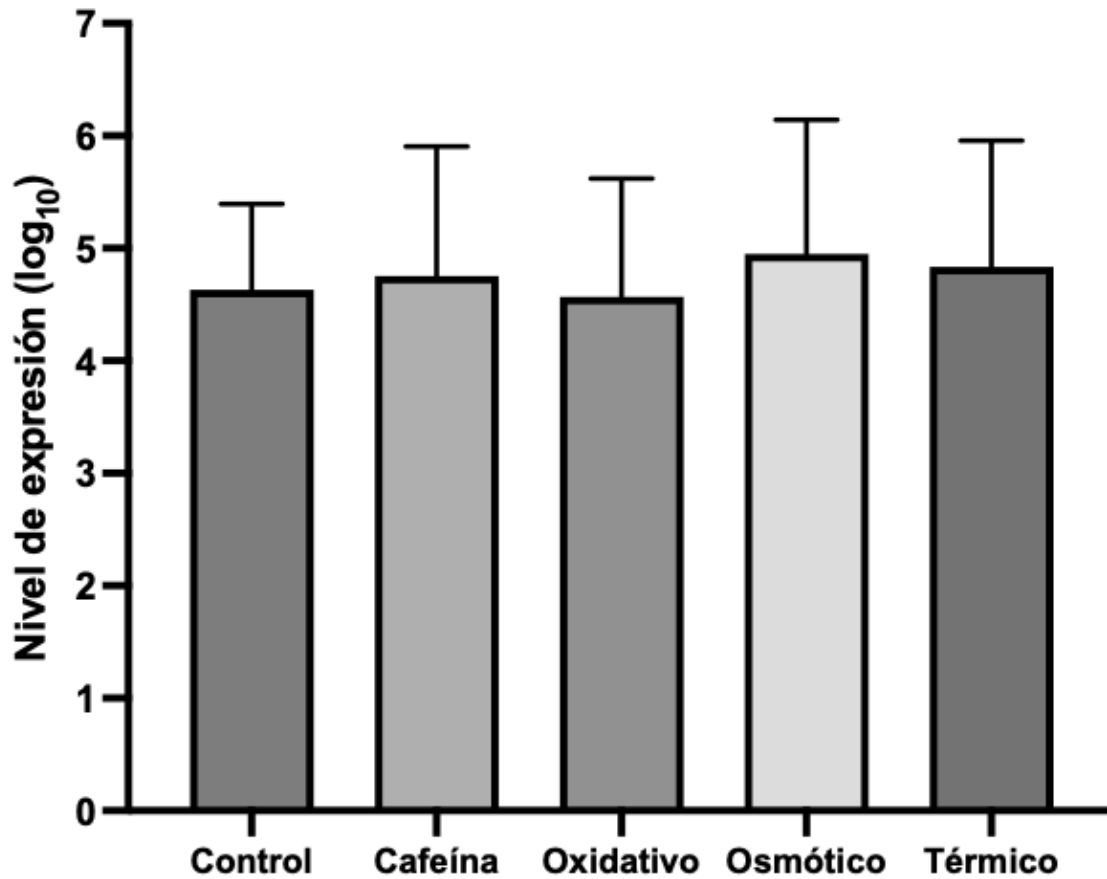
Los valores ( $\log_{10}$ ) corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de cuatro experimentos independientes de cada uno de los tratamientos utilizados. Los datos se obtuvieron mediante análisis de densitometría de bandas y se normalizaron utilizando como valor de referencia la expresión del gen constitutivo *ALG9*. Posteriormente, se convirtieron a  $\log_{10}$  y con estos valores se hicieron las pruebas de normalidad y la prueba ANOVA de una vía.  $p$  = valor de significancia (<0.05). Para la descripción detallada de cada uno de los tratamientos ver 13.2.2.

En las figuras 5-8 se presentan los niveles de expresión expuestos en la tabla 7. Aunque en el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas, los resultados muestran que el mayor nivel de expresión del gen *YAP1* se encontró en el tratamiento con cafeína mientras que el menor nivel de expresión se encontró tanto en el tratamiento con el agente oxidante  $H_2O_2$  (estrés oxidativo) como en el de estrés osmótico (tabla 7, fig. 5); con respecto a los niveles de expresión del gen *SKN7*, el mayor nivel de expresión se encontró en el tratamiento de estrés osmótico mientras que el menor nivel de expresión se encontró en el tratamiento de estrés oxidativo (tabla 7, fig. 6); por otra parte, los niveles

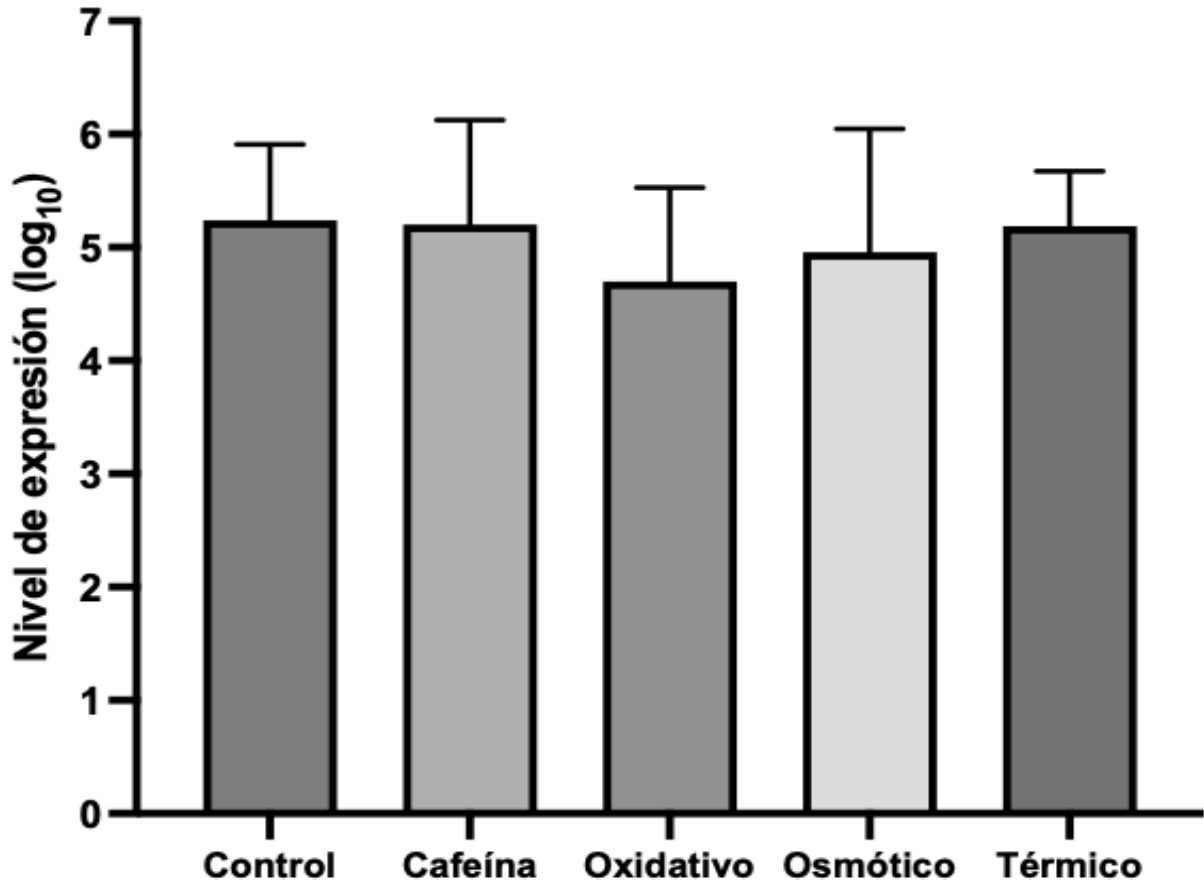
más altos de expresión de los genes *MSN2* y *MSN4* (tabla 7, figs. 7 y 8), se observaron en el tratamiento control (posible estrés -exceso- nutricional) y los menores niveles de expresión, para ambos genes, se presentaron en las células sometidas al tratamiento con estrés oxidativo.



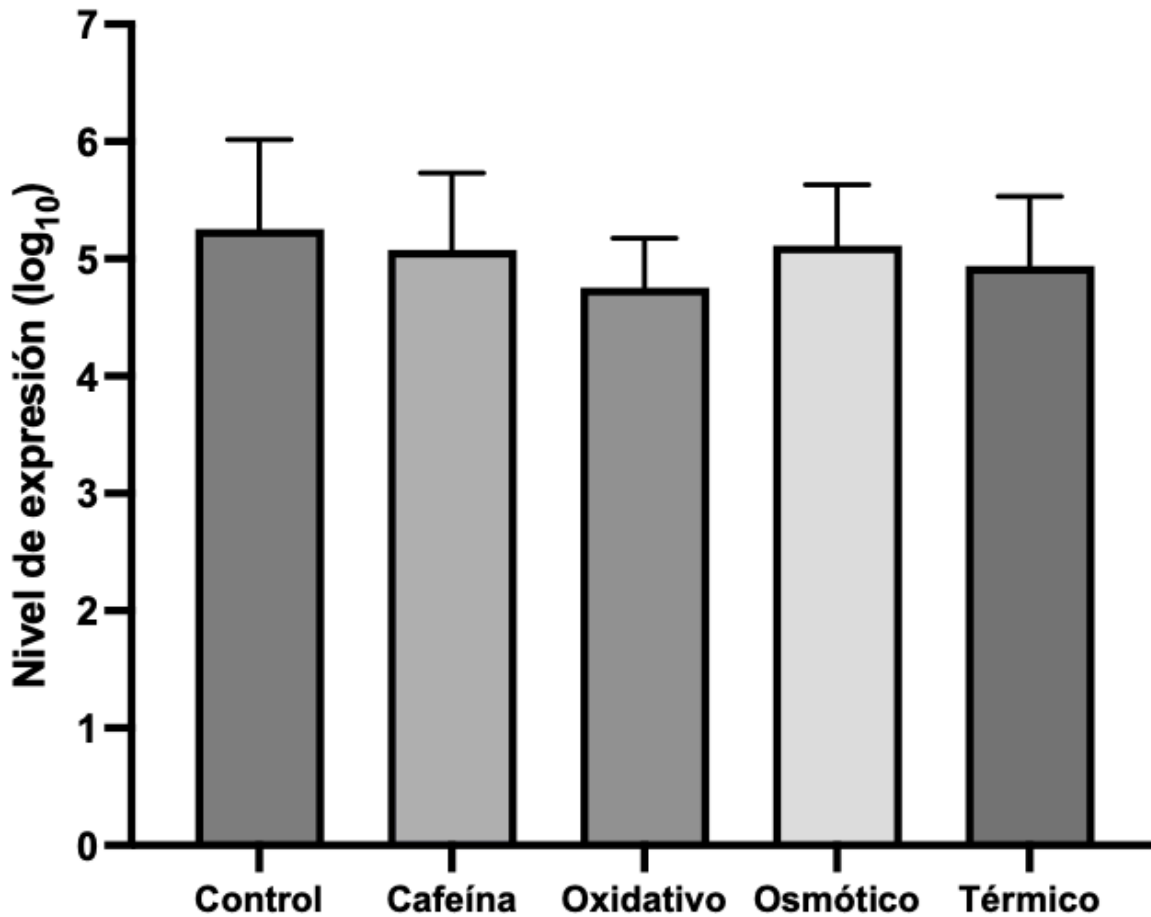
**Fig. 5 Niveles de expresión del gen *YAP1* en células de *Y. lipolytica*, sometidas a diferentes tipos de estrés.** El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de cuatro experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Para una descripción de los diferentes tratamientos (tipos de estrés), ver 13.2.2



**Fig. 6 Niveles de expresión del gen *SKN7* en células de *Y. lipolytica*, sometidas a diferentes tipos de estrés.** El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de cuatro experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Para una descripción de los diferentes tratamientos (tipos de estrés), ver 13.2.2



**Fig. 7 Niveles de expresión del gen *MSN2* en células de *Y. lipolytica*, sometidas a diferentes tipos de estrés.** El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de cuatro experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Para una descripción de los diferentes tratamientos (tipos de estrés), ver 13.2.2



**Fig. 8 Niveles de expresión del gen *MSN4* en células de *Y. lipolytica*, sometidas a diferentes tipos de estrés.** El tamaño de las columnas corresponde al valor promedio de cuatro experimentos independientes; la barra en la parte superior de cada columna representa la desviación estándar. Para una descripción de los diferentes tratamientos (tipos de estrés), ver 13.2.2

## 15. DISCUSIÓN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan mediante procesos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los procesos enzimáticos podemos encontrar la cadena respiratoria, fagocitosis, actividad del sistema citocromo P450, entre otros. Los procesos no enzimáticos comprenden, por ejemplo, la exposición de células a radiaciones ionizantes (Pizzino *et al.*, 2017). Las ROS no siempre se consideran subproductos metabólicos dañinos ya que desempeñan el papel de moléculas de señalización intracelular cuando están estrictamente reguladas; a nivel celular, las ROS contribuyen a funciones complicadas, como la regulación de la presión arterial, las funciones cognitivas y las respuestas inmunitarias (Bardaweel *et al.*, 2018).

Las células poseen un sistema antioxidante para reducir los niveles de ROS para que ejerzan su efecto beneficioso y no su efecto tóxico (ROS en grandes cantidades = EOX); este sistema antioxidante está conformado por enzimas tales como catalasas, superóxido dismutasas y peroxidasas. (Vivancos *et al.*, 2006). Los antioxidantes no enzimáticos son los que se pueden obtener a través de la dieta; además de contener micronutrientes (como vitaminas C, E, cobre, zinc, selenio, etc.), los alimentos contienen fitoquímicos, como carotenoides, polifenoles y compuestos organosulfurados con propiedades benéficas para la salud (Vidović, 2023).

Se ha descrito que el control de la homeostasis de las levaduras se logra mediante un mecanismo altamente coordinado de regulación de la transcripción que involucra varios FT, cada uno de los cuales realiza funciones específicas (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2005) (Hong *et al.*, 2013).

En *S. pombe*, existen dos vías alternativas de regulación del EOX; la vía dependiente de Pap1, que responde a concentraciones moderadas (0.2 mM) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; y la vía MAP quinasa Sty1 la cual se activa no sólo ante dosis tóxicas (1 mM) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sino también en respuesta a choque térmico, estrés osmótico y otras situaciones que comprometen la viabilidad celular. Sólo la sobreexpresión de la vía Pap1, pero no la de Sty1, se ha considerado beneficiosa para superar altas dosis de cafeína (Vivancos *et al.*, 2006).



En un estudio llevado a cabo por Calvo y col., utilizando como organismo modelo *S. pombe* y concentraciones de cafeína entre 0.05-30 mM, por un periodo de tiempo de hasta 30 min, se encontró que la cafeína indujo la fosforilación de la MAP quinasa Sty1, lo que desencadenó una rápida translocación de Sty1-GFP (Green Fluorescent Protein) desde el citosol hacia el núcleo, así como la fosforilación y acumulación de su principal sustrato, el FT Atf1. Se concluyó que la cafeína activa la principal vía de respuesta antiestrés global la cual es necesaria para sobrevivir en situaciones ambientales hostiles para las células (Calvo *et al.*, 2009). En el presente trabajo, con la intención de identificar el FT que regula la transcripción de los genes responsables de la respuesta celular antioxidante en células de *Y. lipolytica*, las células se sometieron al efecto de diferentes tipos de estrés (con cafeína, estrés oxidativo, estrés osmótico, estrés térmico).

En el presente trabajo, con la intención de identificar el FT que regula la transcripción de los genes responsables de la respuesta celular antioxidante en células de *Y. lipolytica*, las células se sometieron al efecto de diferentes tipos de estrés (cafeína, oxidativo, osmótico, térmico).

El objetivo de utilizar todos estos tipos de estrés fue identificar el FT específico de respuesta a EOx y comparar si el patrón de expresión del gen regulado por dicho FT era igual/similar en las células sometidas al efecto de la cafeína ya que se pretendía responder si la cafeína tiene, al igual que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un efecto prooxidante (que genera EOx) y que, debido a ello, mediado por la acción de este FT, se “dispara” la respuesta celular antioxidante incremento en la expresión de genes *CAT*, *SOD* y *GPX* como anteriormente se describió en el trabajo llevado a cabo por Castillo (2022).

En el presente trabajo, no se observó incremento en la expresión del gen *YAP1* -homólogo de *PAP1*-, cuando las células se sometieron a EOx (inducido por la adición de 5 Mm de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), lo cual coincide con lo descrito previamente en la levadura *S. pombe* donde se describe que la peroxiredoxina Tpx1 se ha identificado como un componente de la activación de la vía Pap1. En este organismo, altas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducen la oxidación de un residuo de cisteína en Tpx1 a ácido sulfínico, lo que conduce a su inactivación temporal. En consecuencia, Tpx1 sólo puede transferir la señal redox a Pap1 bajo concentraciones moderadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es decir, cuando las células están expuestas a

niveles moderados de  $H_2O_2$ , la proteína Tpx1 puede reducir el  $H_2O_2$  y al mismo tiempo transferir una señal redox a Pap1, activando una respuesta antioxidante. Sin embargo, si los niveles de  $H_2O_2$  son muy altos, Tpx1 se oxida en exceso, lo que conduce a su inactivación temporal y a la incapacidad de activar Pap1 (Bozonet *et al.*, 2005; Vivancos *et al.*, 2005). Es posible que, en nuestro modelo experimental y/o bajo las condiciones experimentales usadas (5 mM de  $H_2O_2$ ) también se esté generando la inactivación de un posible análogo de Tpx1, por lo que no se pueda activar la vía dependiente de Yap1, lo cual explicaría la ausencia de sobreexpresión del gen que codifica para este FT, en las células sometidas a EOx. Otra posible explicación de los resultados obtenidos es que, en este organismo modelo (*Y. lipolytica*), Yap1 actúe como un FT de respuesta general a estrés ya que no se observan cambios en la expresión del gen bajo ninguna de las condiciones (tipos de estrés) probadas.

Con respecto al análisis de expresión del FT Skn7, en las células sometidas a los diferentes tipos de estrés, se observó una tendencia (aumento en la expresión del gen), como respuesta a los tratamientos de estrés osmótico y térmico. En *S. cerevisiae*, la actividad de Skn7 se ha relacionado con la respuesta a diferentes tipos de estrés: estrés oxidativo, estrés osmótico e incluso a formas específicas de crecimiento celular (crecimiento filamentosos diploide inducido por falta de nitrógeno). Además, Skn7 posee un dominio de unión al ADN del tipo factor de choque térmico (HSF), lo que sugiere que también está involucrado en la respuesta al choque térmico en esta especie (Basso *et al.*, 2017). Es posible que en células de *Yarrowia lipolytica*, este FT tenga una participación en la regulación de la expresión de los genes que codifican para proteínas responsables de la respuesta celular, tanto al estrés oxidativo, como al estrés térmico, lo cual podría explicar el aumento de la expresión del gen *SKN7* en condiciones de estrés térmico y osmótico.

En *S. cerevisiae* la respuesta ante shock térmico es mediada por los FT Hsf1, Msn2 y Msn4 e involucra la regulación de genes para las proteínas de shock térmico (Hsps). Durante el proceso de adaptación al shock térmico, Hsf1 se encarga de poder volver a un estado de homeostasis tras una exposición breve a temperaturas extremas, mientras que el binomio Msn2/Msn4 (formado por los FT Msn2/Msn4) es necesario para la supervivencia a temperaturas extremas por tiempo prolongado (Castells-Roca *et al.*,

2011). Los estudios de expresión genómica de células de levadura han revelado que la expresión de *MSN2* es constitutiva en todas las condiciones, mientras que la expresión del gen *MSN4* es inducida por estrés y la inducción está mediada por sí mismo y por Msn2. En el presente trabajo a pesar de no haber obtenido diferencias significativas, se puede observar que la variabilidad entre los niveles de expresión de *MSN2* en los diferentes tratamientos, es mínima, lo cual coincide con lo mencionado. Se ha descrito que dos vías de sensado de nutrientes desempeñan funciones reguladoras en el control de Msn2/4: la vía de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc (Adenosín Monofosfato Cíclico) y la vía TOR (Target Of Rapamycin). La actividad de la PKA está regulada por la suficiencia de nutrientes mediante la modulación de los niveles de AMPc celular mediante la activación de la proteína G y la adenilato ciclasa. Los niveles bajos de actividad de la vía PKA provocados por estrés térmico o el crecimiento en medio con exceso de glucosa (estrés nutricional) dan como resultado la acumulación nuclear de Msn2 y Msn4 en ausencia de estrés, mientras que los niveles altos de actividad de la vía PKA bloquean la localización nuclear de los factores de transcripción en las células estresadas (Verghese *et al.*, 2012). Dicho de otra forma, cuando los niveles de PKA son bajos, como en condiciones de estrés térmico o exceso de glucosa, Msn2 y Msn4 se translocan al núcleo de la célula, incluso en ausencia de estrés, pero cuando la PKA está activa (altos niveles de AMPc), impide que Msn2 y Msn4 entren al núcleo, incluso si las células están bajo estrés. De esta manera, se evita la activación de genes de estrés en condiciones normales, asegurando que estos FT solo respondan cuando sea necesario. Esto podría explicar por qué se observa un mayor nivel de expresión de *MSN2* y *MSN4* en las células del grupo control, las cuales fueron cultivadas en medio YPD que contiene 2% de glucosa, lo cual puede inducir estrés nutricional ya que, con esta concentración de glucosa, aumenta la producción de ROS, como lo reportan Maslanka y col. (2017).

Aunque la expresión de todos los FT evaluados fue similar en las células del grupo control que en las células tratadas con los agentes estresantes, es importante mencionar que solo *MSN2* y *MSN4* mostraron un mayor nivel de expresión en el grupo control que en los demás grupos.

Estudios de asociación de genes (investigaciones que buscan identificar genes asociados con un rasgo o riesgo de enfermedad) han descrito otros FT que se activan bajo

condiciones de estrés en levaduras, por ejemplo, Hsf1 y Pdr3 como FT en la respuesta ante estrés oxidativo. El estado de fosforilación de Hsf1 cambia durante el estrés oxidativo, lo que indica que la actividad de Hsf1 se modifica bajo este tipo de estrés; el FT Hot1 es necesario para la inducción transitoria de los genes biosintéticos de glicerol *GPD1* y *GPP2* en respuesta a una alta osmolaridad y, por otra parte, Sfp1, Pdr3, Rpn4 y Stp1 son FT de choque térmico (Wu & Chen, 2009).

En la ejecución del presente proyecto de investigación se observaron ciertas limitaciones que a continuación se describen: el tamaño de muestra fue pequeño (cuatro experimentos independientes); es posible que, al tener un tamaño de muestra mayor (mayor número de experimentos), se puedan encontrar diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los diferentes genes. Adicionalmente, se debe considerar que, aunque en este trabajo se incluyó un grupo experimental (control) correspondiente a células cultivadas en medio YPD (condiciones de ausencia de estrés). En la literatura se indica que en las células que crecen en glucosa, Msn2 se localiza principalmente en el citosol, mientras que en ausencia de fuente de carbono, se localiza dentro del núcleo. En un estudio del 2002 se describió que la vía de represión de la glucosa de la proteína quinasa Snf1 participa activamente en la regulación de la localización subcelular de Msn2 en respuesta a la glucosa y de esta manera, una proteína quinasa activa Snf1 pudo afectar la regulación de la localización de Msn2 y la hizo insensible a la falta de carbono. Como resultado, se evitó la activación de genes regulados por STRE (respuesta general a estrés) y tanto *MSN2* como *MSN4* pertenecen a este grupo de genes (Mayordomo *et al.*, 2002). Lo anterior podría explicar por qué al comparar los niveles de expresión de los diferentes genes analizados, no se hayan observado cambios: 1) en ninguno de los genes analizados y 2) bajo ninguna de las condiciones (tipos de estrés) probadas. Por último, hay que considerar que a pesar de que la técnica de PCR semicuantitativa es ampliamente utilizada para estudios de expresión de genes, actualmente se cuenta con otras técnicas que ofrecen resultados más precisos (Ej. PCR en tiempo real: técnica cuantitativa); sin embargo, al ser técnicas más refinadas representan un mayor costo lo cual las vuelve poco asequibles para la mayoría de los proyectos.

En este proyecto se consideró de gran importancia incluir la cafeína ya que, como se ha mencionado, es una sustancia presente en la cotidianidad de la población. Para el

desarrollo de este proyecto se consideró evaluar el efecto de la cafeína sobre la respuesta celular al estrés oxidativo, la cual que es una condición que puede comprometer la salud ocasionando enfermedades crónicas. A pesar de que este proyecto no tenga una aplicación inmediata en humanos, es importante destacar que este tipo de estudios que utilizan organismos modelo permiten estudiar mecanismos biológicos que se han conservado evolutivamente con la intención de extrapolar los resultados y tratar de entender lo que sucede en organismos más complejos. El uso de organismos menos complejos (eucariotas unicelulares), se favorece ya que es posible la manipulación genética de los mismos para estudiar funciones específicas (estos organismos ya tienen su genoma secuenciado), mientras que en organismos eucariotas superiores (*Homo sapiens*), aunque se cuente con la información correspondiente a su genoma (genoma secuenciado) es difícil realizar este tipo de estudios, principalmente por restricciones éticas. Por lo tanto, considerando este tipo de restricciones a nivel ético (en el caso de humanos), es que los organismos modelo son una opción viable para dar solución a muchos de los cuestionamientos que se tienen en el ámbito de la ciencia básica.

## 16. CONCLUSIONES

En trabajos previos se ha descrito que la cafeína estimula la expresión de los genes que codifican para proteínas (enzimas) implicadas en la respuesta celular antioxidante; sin embargo, no se ha descrito el mecanismo mediante el cual ejerce este efecto. Utilizando la levadura *Yarrowia lipolytica* como organismo modelo bajo las condiciones establecidas para la realización del presente trabajo, no se observaron diferencias significativas entre los niveles de expresión de los genes analizados (*YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4*).

Aunque no se observaron diferencias significativas (estadísticamente) en los resultados, se puede identificar una tendencia en la disminución de la expresión de los genes *MSN2* y *MSN4*, en las células sometidas a estrés oxidativo y osmótico, con respecto al grupo control mientras que con los genes *YAP1* y *SKN7* vemos lo opuesto, ya que la expresión de estos genes aumenta con respecto al grupo control en las células tratadas con cafeína y estrés osmótico.

Los resultados obtenidos tras la realización del presente proyecto indican que los FT Yap1, Skn7, Msn2 y Msn4 no regulan el patrón de expresión de los genes de respuesta antioxidante estimulada por cafeína, en células de *Yarrowia lipolytica*. Esto al menos, bajo las condiciones que se utilizaron para fines de la realización de este proyecto.

En general, podemos concluir que los resultados obtenidos no permiten aceptar la hipótesis planteada para el presente trabajo debido a que no se observaron patrones diferentes de expresión en los diferentes genes analizados (*YAP1*, *SKN7*, *MSN2* y *MSN4*), en presencia de cafeína.

- Sería interesante llevar a cabo un estudio similar donde se evalúe la expresión de genes correspondientes a otros FT relacionados con estrés.
- Además, será necesario utilizar como grupo control células cultivadas en cantidades menores de glucosa (<2%) ya que se ha observado que tal cantidad puede influir en la expresión de genes de respuesta general a estrés como *MSN2* y *MSN4*.

## 17. REFERENCIAS

- Adeoye, O., Olawumi, J., Opeyemi, A., & Christiania, O. (2017). Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assisted Reproduction*, 22(1), 61-66. DOI: 10.5935/1518-0557.20180003.
- 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). 13145. DOI: 10.1111/jfbc.13145.
- Aslani, B. A., & Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sciences*, 146, 163-173. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.01.014.
- Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., & Hadi, S. M. (2003). Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 9(9), 325-330.
- Bakker, R., Steegers, E. A., Obradov, A., Raat, H., Hofman, A., & Jaddoe, V. W. (2010). Maternal caffeine intake from coffee and tea, fetal growth, and the risks of adverse birth outcomes: the generation R study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(6), 1691–1698. DOI: 10.3945/ajcn.2009.28792.

Baldissera, M. D., Souza, C. F., & Descovi, S. N., Petrolli, T. G., da Silva, A. S. & Baldisserotto, B. (2019). A caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and prevents oxidative damage in the livers of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to hypoxia. *Fish Physiology and Biochemistry*, 45(3), 1041–1049. DOI: 10.1007/s10695-019-00616-7.

Bardaweel, S. K., Gul, M., Alzweiri, M., Ishaqat, A., ALSalamat, H. A., & Bashatwah, R. M. (2018). Reactive oxygen species: the dual role in physiological and pathological conditions of the human body. *Eurasian Journal of Medicine*, 50(3): 193-201. DOI: 10.5152/eurasianjmed.2018.17397.

Basso, V., Znaidi, S., Lagage, V., Cabral, V., Schoenherr, F., LeibundGut-Landmann, S., d'Enfert, C., & Bachellier-Bassi, S. (2017). The two-component response regulator Skn7 belongs to a network of transcription factors regulating morphogenesis in *Candida albicans* and independently limits morphogenesis-induced ROS accumulation. *Molecular Microbiology*, 106(1), 157-182. DOI: 10.1111/mmi.13758.

Batty, M., Bennett, M. R., & Yu, E. (2022). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Cells*, 11(23), 3843. DOI: 10.3390/cells11233843.

Bhattacharya, S. (2015). Reactive oxygen species and cellular defense system en Rani, V., Yadav, U. (Ed.), *Free Radicals in Human Health and Disease*. (pp. 17-29). Springer. DOI: 10.1007/978-81-322-2035-0\_2.



- Bozonet S. M., Findlay V. J., Day A. M., Cameron J., Veal, E. A., & Morgan, B. A. (2005) Oxidation of a eukaryotic 2-Cys peroxiredoxin is a molecular switch controlling the transcriptional response to increasing levels of hydrogen peroxide. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 23319–23327. DOI: 10.1074/jbc.M502757200.
- Calvo, I. A., Gabrielli, N., Iglesias-Baena, I., García-Santamarina, S., Hoe, K. L., Kim, D. U., Sansó, M., Zuin, A., Pérez, P., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2009). Genome-wide screen of genes required for caffeine tolerance in fission yeast. *PloS One*, 4(8), 6619. DOI: 10.1371/journal.pone.0006619.
- Castells-Roca, L., García-Martínez, J., Moreno, J., Herrero, E., Bellí, G., & Pérez-Ortín, J. E. (2011). Heat shock response in yeast involves changes in both transcription rates and mRNA stabilities. *Plos One*, 6(2), 17272. DOI: 10.1371/journal.pone.0017272.
- Castillo, M. (2022). *La cafeína modula el patrón de expresión de genes involucrados en la respuesta antioxidante de Yarrowia lipolytica* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/26054/1/1080312606.pdf>.
- Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A. O., Yeskaliyeva, B., Abdull, A. F., Modu, B., Calina, D., & Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1158198. DOI: 10.3389/fchem.2023.1158198.
- Choi, J. E., Heo, S. H., & Chung, W. H. (2022). Yap1-mediated Flr1 expression reveals crosstalk between oxidative stress signaling and caffeine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1026780. DOI: 10.3389/fmicb.2022.1026780.

Choi, E. Y., Jang J. Y., & Cho, Y. O. (2010). Coffee intake can promote activity of antioxidant enzymes with increasing MDA level and decreasing HDL-cholesterol in physically trained rats, *Nutrition Research and Practice*, 4(4) 283-289. DOI: 10.4162/nrp.2010.4.4.283.

Chung, W. (2021). Pleiotropic effects of caffeine leading to chromosome instability and cytotoxicity in eukaryotic microorganisms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 171-180. DOI: 10.4014/jmb.2011.11042.

Cuéllar-Cruz, M., López-Romero, E., Ruiz-Baca, E., & Zazueta-Sandoval, R. (2014). Differential response of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to oxidative and nitrosative stresses. *Current microbiology*, 69(5), 733–739. DOI: 10.1007/s00284-014-0651-3.

Czachor, J., Miłek, M., Galiniak, S., Stępień, K., Dżugan, M., & Mołoń, M. (2020). Coffee extends yeast chronological lifespan through antioxidant properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9510 DOI: 10.3390/ijms21249510.

De Jonge, W. J., Patel, H. P., Meeussen, J. V. W., & Lenstra, T. L. (2022). Following the tracks: how transcription factor binding dynamics control transcription. *Biophysical Journal*, 121(9), 1583-1592. DOI: 10.1016/j.bpj.2022.03.026.

Dunnill, C., Patton, T., Brennan, J., Barrett, J., Dryden, M., Cooke, J., Leaper, D., & Georgopoulos, N. T. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, 14(1), 89–96. DOI: 10.1111/iwj.12557.

Eleutherio, E. C. A., de Araújo Brasil, A., Braga França, M., Gomes De Almeida, D. S., Breves Rona, G., & Silva Magalhães, R. S. (2018). Oxidative stress and aging: learning from yeast lessons. *Fungal Biology*, 122(6), 514-525. DOI: 10.1016/j.funbio.2017.12.003.

Eleutherio, E. C. A., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R., & De Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 697, 108701. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108701.

Elhasi, T., & Blomberg, A. (2023). Caffeine activates HOG-signalling and inhibits pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMed Central Research Notes*, 16, 52. DOI: 10.1186/s13104-023-06312-3.

Faudone, G., Arifi, S., & Merk, D. (2021). The medicinal chemistry of caffeine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(11), 7156-7178. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00261.

Gómez-Pastor, R., Garre, E., Pérez-Torrado, R., & Matallana, E. (2013). Trx2p-dependent regulation of *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response by the Skn7p transcription factor under respiring conditions. *Plos One*, 8(12). DOI: 10.1371/journal.pone.0085404.

Hardy, M., Zielonka, J., Karoui, H., Sikora, A., Michalski, R., Podsiadły, R., Lopez, M., Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., & Ouari, O. (2018). Detection and characterization of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems by monitoring species-specific products. *Antioxidants & Redox Signaling*, 28(15), 1416-1432. DOI: 10.1089/ars.2017.7398.

He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532-553. DOI: 10.1159/000485089.

He, H., Yang, M., Li, S., Zhang, G., Ding, Z., Zhang, L., Shi, G., & Li, Y. (2023). Mechanisms and biotechnological applications of transcription factors. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 8(4), 565–577. DOI: 10.1016/j.synbio.2023.08.006.

Hoffman, C., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272. DOI: 10.1016/0378-1119(87)90131-4.

Hong, Y., Boiti, A., Vallone, D., & Foulkes, N. S. (2024). Reactive oxygen species signaling and oxidative stress: transcriptional regulation and evolution. *Antioxidants*, 13(3), 312. DOI: 10.3390/antiox13030312.

Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research (2001) Caffeine for the sustainment of mental task performance: formulations for military operations. Washington (DC): National Academies Press (US). Pharmacology of caffeine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK223808/>.

Jach, M. E., & Malm, A. (2022). *Yarrowia lipolytica* as an alternative and valuable source of nutritional and bioactive compounds for humans. *Molecules*, 27(7), 2300. DOI: 10.3390/molecules27072300.

Kaczmarczyk-Sedlak I., Folwarczna J., Sedlak L., Zych M., Wojnar W., Szumińska I., Wyględowska-Promieńska D., & Mrukwa-Kominek, E. (2019). Effect of caffeine on biomarkers of oxidative stress in lenses of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Archives of Medical Science*, 15(4), 1073-1080. DOI: 10.5114/aoms.2019.85461.

Kaltsas, A. (2023). Oxidative stress and male infertility: the protective role of antioxidants. *Medicina*, 59(10), 1769. DOI: 10.3390/medicina59101769.

Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019). Antioxidant properties of milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 41. DOI: 10.1186/s12944-019-0969-8.

Kumar, S., Sharma, S., & Vasudeva, N. (2017). Review on antioxidants and evaluation procedures. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 1-12. DOI: 10.1007/s11655-017-2414-z.

Laurent, J. M., Young, J. H., Kachroo, A. H., & Marcotte, E. M. (2016). Efforts to make and apply humanized yeast. *Briefings in Functional Genomics*, 15(2), 155-163. DOI: 10.1093/bfpg/elv041.

Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152(6), 1237–1251. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.014.

- Luan, R., Ding, D., Xue, Q., Li, H., Wang, Y., & Yang, J. (2023). Protective role of zinc in the pathogenesis of respiratory diseases. *European Journal of Clinical Nutrition*, 77(4), 427-435. DOI: 10.1038/s41430-022-01191-6.
- Maslanka, R., Kwolek-Mirek, M., & Zadrag-Tecza, R. (2017). Consequences of calorie restriction and calorie excess for the physiological parameters of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Research*, 17(8). DOI: 10.1093/femsyr/fox087.
- Mat Nanyan, N. S. B., & Takagi, H. (2020). Proline homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*: how does the stress-responsive transcription factor Msn2 play a role? *Frontiers in Genetics*, 11, 438. DOI: 10.3389/fgene.2020.00438.
- Mayordomo, I., Estruch, F., & Sanz, P. (2002). Convergence of the target of rapamycin and the Snf1 protein kinase pathways in the regulation of the subcellular localization of Msn2, a transcriptional activator of STRE (Stress Response Element)-regulated genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35650–35656. DOI:10.1074/jbc.M204198200.
- Mazzocca, M., Colombo, E., Callegari, A., & Mazza, D. (2021). Transcription factor binding kinetics and transcriptional bursting: What do we really know? *Current Opinion in Structural Biology*, 71, 239-248. DOI: 10.1016/j.sbi.2021.08.002.
- Miranda, O. (2016). *El envejecimiento modifica la expresión de genes de respuesta antioxidante en Yarrowia lipolytica* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/13875/>.

- Młynarska, E., Hajdys, J., Czarnik, W., Fularski, P., Leszto, K., Majchrowicz, G., Lisińska, W., Rysz, J., & Franczyk, B. (2024). The role of antioxidants in the therapy of cardiovascular diseases-a literature review. *Nutrients*, *16*(16), 2587. DOI: 10.3390/nu16162587.
- Mohammadi, S., Saberidokht, B., Subramaniam, S., & Grama, A. (2015). Scope and limitations of yeast as a model organism for studying human tissue-specific pathways. *BMC Systems Biology*, *9*, 96. DOI: 10.1186/s12918-015-0253-0.
- Niki E. (2015). Evidence for beneficial effects of vitamin E. *The Korean Journal of Internal Medicine*, *30*(5), 571–579. DOI: 10.3904/kjim.2015.30.5.571.
- Ogunwole, E., Emojevwe, V. O., Shittu, H. B., Olagoke, I. E., & Ayodele, F. O. (2024). Deleterious effects of caffeine consumption on reproductive functions of female wistar rats. *JBRA Assisted Reproduction*, DOI: 10.5935/1518-0557.20240055.
- Papavassiliou, K. A., & Papavassiliou, A. G. (2016). Transcription factor drug targets. *Journal of Cellular Biochemistry*, *117*(12), 2693–2696. DOI:10.1002/jcb.25605.
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017. DOI: 10.1155/2017/8416763.
- Priya Dharsini, L. C., Vishnupriya, S., Sakthivel, K. M., & Rasmi, R. R. (2020). Oxidative stress responsive transcription factors in cellular signalling transduction mechanisms. *Cellular Signalling*, *72*, DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109670.

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. DOI: 10.1007/s00203-019-01658-4.

Raj, S. N., Tiwari, N., Singh, P., Mishra, D., Singh, A. K., Hooshmandi, E., Vamanu, E., & Singh, M. P. (2021). Therapeutic potential of vital transcription factors in Alzheimer's and Parkinson's Disease with particular emphasis on transcription factor EB mediated autophagy. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 777347. DOI: 10.3389/fnins.2021.777347.

Reddy, V. P. (2023). Oxidative stress in health and disease. *Biomedicines*, 11(11), 2925. DOI: 10.3390/biomedicines11112925.

Reddy, V. S., Shiva S., Manikantan, S., & Ramakrishna, S. (2024). Pharmacology of caffeine and its effects on the human body, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 100138(10). DOI: 10.1016/j.ejmcr.2024.100138.

Rendra, E., Riabov, V., Mossel, D. M., Sevastyanova, T., Harmsen, M. C., & Kzhyshkowska, J. (2019). Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology*, 224(2), 242-253. DOI: 10.1016/j.imbio.2018.11.010.

Rodrigues-Pousada, C., Devaux, F., Caetano, S. M., Pimentel, C., da Silva, S., Cordeiro, A. C., & Amaral, C. (2019). Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview. *Microbial Cell*, 6(6), 267-285. DOI: 10.15698/mic2019.06.679.



Rodrigues-Pousada, C., Nevitt, T., & Menezes, R. (2005). The yeast stress response. Role of the Yap family of b-ZIP transcription factors. The PABMB Lecture delivered on 30 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. *The FEBS journal*, 272(11), 2639–2647. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04695.x

Ruta, L. L., & Farcasanu, I. C. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and caffeine implications on the eukaryotic cell. *Nutrients*, 12(8), 2440. DOI: 10.3390/nu12082440.

Ruta, L.L., Oprea, E., Popa, C. V., & Farcasanu, I. C. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking transcription factors Skn7 or Yap1 exhibit different susceptibility to cyanidin. *Heliyon*, 6(10). DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e05352.

Saini, R. K., Prasad, P., Lokesh, V., Shang, X., Shin, J., Keum, Y. S., & Lee, J. H. (2022). Carotenoids: dietary sources, extraction, encapsulation, bioavailability, and health benefits-a review of recent advancements. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(4), 795. DOI: 10.3390/antiox11040795.

Sies, H., Belousov, V. V., Chandel, N. S., Davies, M. J., Jones, D. P., Mann, G. E., Murphy, M. P., Yamamoto, M., & Winterbourn, C. (2022). Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(7), 499-515. DOI: 10.1038/s41580-022-00456-z.

Sifuentes, E. (2014). *Efecto genotóxico de la cafeína sobre células de Yarrowia lipolytica deficientes en los mecanismos de reparación del ADN* [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/4367/>.

Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. & Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, 24(8), 1583. DOI: 10.3390/molecules24081583.

Smith, M. G., & Snyder, M. (2006). Yeast as a model for human disease. *Current Protocols in Human Genetics*, 48, 15.6.1-15.6.8. DOI: 10.1002/0471142905.hg1506s48.

Teleanu, D.M., Niculescu, A. G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladâcenco, O., Roza, E., Costăchescu, B., Grumezescu, A. M., & Teleanu, R. I. (2022). An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5938. DOI: 10.3390/ijms23115938.

Thines, L., Deschamps, A., Stribny, J., & Morsomme, P. (2019). Yeast as a tool for deeper understanding of human manganese-related diseases. *Genes*, 10(7), 545. DOI: 10.3390/genes10070545.

Tinggi U. (2008) Selenium: its role as antioxidant in human health. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13(2), 102-8. DOI: 10.1007/s12199-007-0019-4.

Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., & Sobolev, A. S. (2018). Transcription factors: time to deliver. *Journal of Controlled Release*, 269, 24-35. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.11.004.

Utomo, H. D. (2008). Reducing copper toxicity by drinking coffee. *WIT Transactions in Ecology and the Environment*, 110, 199–207. DOI: 10.2495/ETOX080211.

- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., Morano, K. A. (2012). Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 115-58. DOI: 10.1128/MMBR.05018-11.
- Vidović, B. (2023). Dietary antioxidants and health effects: What are their optimal intakes? *Archives of Pharmacy*, 73, 278-291. DOI: 10.5937/arhfarm73-45552.
- Vivancos, A. P., Castillo, E. A., Biteau, B., Nicot, C., Ayté, J., Toledano, M. B. & Hidalgo, E. (2005). A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(25), 8875–8880. DOI: 10.1073/pnas.0503251102.
- Vivancos, A., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M., & Hidalgo, E. (2006). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Molecular genetics and genomics: MGG*, 276, 495–502. DOI: 10.1007/s00438-006-0175-z.
- Wang, S., Shi, L., Hu, Y., Liu, R., Ren, A., Zhu, J., & Zhao, M. (2018). Roles of the Skn7 response regulator in stress resistance, cell wall integrity and GA biosynthesis in *Ganoderma lucidum*. *Fungal Genetics and Biology*, 114, 12-23. DOI: 10.1016/j.fgb.2018.03.002.
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., & Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915-1928. DOI: 10.1083/jcb.201708007.

Wangler, M. F., Yamamoto, S., Chao, H. T., Posey, J. E., Westerfield, M., Postlethwait, J., Hieter, P., Boycott, K., Campeau, P., & Bellen, H. (2017). Model organisms facilitate rare disease diagnosis and therapeutic research. *Genetics*, *207*(1), 9-27. DOI: 10.1534/genetics.117.203067.

Willson, C. (2018). The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports*, *5*, 1140-1152. DOI: 10.1016/j.toxrep.2018.11.002.

Wu, W. S., & Chen, B. S. (2009) Identifying stress transcription factors using gene expression and TF-gene association data. *Bioinformatics and Biology Insights*. *1*,137-45. DOI: 10.4137/BBI.S292.

Xiao, J., Khan, M. Z., Ma, Y., Alugongo, G. M., Ma, J., Chen, T., Khan, A., & Cao, Z. (2021). The antioxidant properties of selenium and vitamin E; their role in periparturient dairy cattle health regulation. *Antioxidants*, *10*(10), 1555. DOI: 10.3390/antiox10101555.

Xu, H., Gan, C., Gao, Z., Huang, Y., Wu, S., Zhang, D., Wang, X., & Sheng, J. (2020). Caffeine targets SIRT3 to enhance SOD2 activity in mitochondria. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 822. DOI:10.3389/fcell.2020.00822.

Yang, S., & Lian, G. (2020). ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *467*(1-2), 1-12. DOI: 10.1007/s11010-019-03667-9.