

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**EFFECTO GENOTÓXICO DE LA CAFÉINA SOBRE CÉLULAS DE**  
***Yarrowia lipolytica* DEFICIENTES EN LOS MECANISMOS**  
**DE REPARACIÓN DEL ADN**

**Por**

**EVELYN SIFUENTES GASPAR**

**Como requisito parcial para obtener el grado de**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**Diciembre, 2014**

## AGRADECIMIENTO

Quiero Agradecer a Dios por ordenar mi vida, por ayudarme a dejar atrás muchos afanes que tenía mostrándome el verdadero valor de las cosas, como el de este trabajo, que aunque solo es tinta y papel fue por un tiempo motivo de aflicción con el que aprendí cuán grande es Él y cuán poco sabemos nosotros. Así mismo, le estoy agradecida por disponer a cada uno de los que me ayudaron a realizar este trabajo:

Mis padres, con su sustento y apoyo en cada una de las decisiones que he tomado.

Mi hermano mayor Gustavo Sifuentes, con palabras que me animaron a venir a esta ciudad.

La familia Galván López, que me recibió, me cobijó y compartió mi comienzo en una vida nueva.

El Dr. Eduardo Campos Góngora, aceptándome en el laboratorio de Proteómica del CINSP y dirigiendo la realización de esta tesis.

La asesoría de la Dra. Blanca E. Gonzáles y del Dr. Zacarías Jiménez Salas.

La Universidad Autónoma de Nuevo León, la Facultad en Salud Pública y Nutrición y el personal del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública, con todas las facilidades brindadas durante mi formación académica.

La MTI Sylvia Osorio de Dios, disponiendo de su tiempo para orientarme.

La familia Serna Cantú, que procuró estar siempre al pendiente de mí.

Mis compañeras de maestría Laura Vázquez, Nancy Juárez e Hilda Ávila, de quienes aprendí muchas cosas.

Carolina Quiñonez, Joselina Huerta y Karen Ríos, ayudándome, animándome y sobre todo compartiendo momentos muy importantes.

El equipo en turno del laboratorio de Proteómica: Alejandra Briones, Katya Cabrales, Fabiola Fuentes, Homero Villarreal, Gilberto Amaro, Karla Martínez y Jorge Gonzáles, apoyando en todo lo necesario para la realización de los experimentos.

Los compañeros del Laboratorio de Alimentos, quienes siempre me brindaron su ayuda.

Y mi guapo Israel Alcorta, alentándome siempre de manera alegre, acompañándome en el cierre de este capítulo y el comienzo de muchos más juntos.

**A MIS PADRES:**

*Gustavo Sifuentes Trujillo*

*Ma. Leonor Gaspar Orenday*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
2.1.	Definición del problema	4
2.2.	Justificación	4
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>5</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
4.1.	Objetivo general	6
4.2.	Objetivos específicos	6
<b>5.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
5.1.	Historia y consumo de la cafeína	7
5.2.	Descripción de la cafeína	8
5.3.	Propiedades de la cafeína	8
5.4.	Metabolismo de la cafeína	9
5.5.	Efectos fisiológicos de la cafeína en el ser humano	9
5.6.	Cafeína y efecto antioxidante	11
5.7.	Daño al ADN	14
5.8.	Mecanismos de reparación del ADN	16
5.8.1.	La reparación de escisión de nucleótidos	16
5.8.2.	Reparación de escisión de bases	16
5.8.3.	Recombinación homóloga	17
5.8.4.	Recombinación de extremos no homólogos	19
5.9.	ADN y cafeína	20

5.10.	La levadura como modelo de estudio	21
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
6.1.	Material químico	23
6.2.	Material biológico	23
6.3.	Métodos	23
6.3.1.	Diseño del estudio	23
6.3.2.	Estrategia general	24
6.3.3.	Preparación de medios de cultivo	25
6.3.4.	Solución stock de cafeína	26
6.3.5.	Agente oxidante	26
6.3.6.	Cultivos celulares	26
6.3.7.	Extracción de ADN genómico	27
6.3.8.	Análisis Genotípico	28
6.3.9.	Electroforesis en geles de agarosa	29
6.3.10.	Cálculo del inóculo para los experimentos	30
6.3.11.	Análisis cualitativo	31
6.3.11.1.	Método de dilución en placa para la determinación de las concentraciones de cafeína y peróxido de hidrógeno	de 31
6.3.12.	Análisis cuantitativo	32
6.3.12.1.	Crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> en condiciones de incubación normales	32
6.3.12.2.	Evaluación del posible efecto genotóxico de la cafeína	32
6.3.12.3.	Evaluación del posible efecto antioxidante de la cafeína	33
6.3.12.4.	Determinación de los tiempos de duplicación celular	34
6.3.12.5.	Procesamiento de datos	35
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
7.1.	Caracterización genotípica de las cepas de <i>Yarrowia lipolytica</i>	36
7.2.	Evaluación cualitativa	39
7.2.1.	Selección de las concentraciones de cafeína	39

7.2.2.	Selección de las concentraciones de peróxido de hidrógeno	41
7.3.	Evaluación cuantitativa	42
7.3.1.	Patrón de crecimiento de <i>Y. lipolytica</i>	42
7.3.2.	Efecto genotóxico de la cafeína	44
7.3.3.	La cafeína como posible agente antioxidante	50
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>68</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el ensayo de PCR para el análisis de la cepa $\Delta ku80$ y $\Delta rad52$ de <i>Y. lipolytica</i>	28
Tabla 2. Condiciones de la reacción de PCR para el análisis genotípico de las cepas de <i>Y. lipolytica</i>	29
Tabla 3. Tratamientos propuestos para evaluar el posible efecto antioxidante de <i>Y. lipolytica</i>	34
Tabla 4. Tiempos de duplicación de <i>Y. lipolytica</i> en presencia de cafeína y peróxido de hidrógeno	48
Tabla 5. Disminución porcentual del crecimiento de las cepas de <i>Y. lipolytica</i> sometidas a diferentes tratamientos con cafeína o peróxido de hidrógeno	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la cafeína	8
Figura 2. Capacidad antioxidante de la cafeína ante especies reactivas de oxígeno (ROS)	13
Figura 3. Mecanismo de reparación del ADN por recombinación homóloga	18
Figura 4. Mecanismo de reparación del ADN: unión de extremos no homólogos	19
Figura 5. Estrategia general del trabajo	25
Figura 6. Análisis genotípico de las cepas $\Delta ku80$ , $\Delta rad52$ y P01A de <i>Y. lipolytica</i>	37
Figura 7. Caracterización genotípica de las cepas $\Delta ku80$ y $\Delta rad52$ de <i>Y. lipolytica</i>	38
Figura 8. Efecto de la cafeína sobre el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i>	40
Figura 9. Efecto de distintas concentraciones del agente oxidante ( $H_2O_2$ ) sobre el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i>	42
Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas P01A, $\Delta ku80$ y $\Delta rad52$ de <i>Y. lipolytica</i>	43
Figura 11. Efecto de la cafeína y peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento de <i>Y. lipolytica</i>	45
Figura 12. Crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> a 12 h de incubación con cafeína y peróxido de hidrógeno	47
Figura 13. Efecto de la cafeína y peróxido de hidrógeno sobre el tiempo de duplicación de <i>Y. lipolytica</i>	49
Figura 14. Respuesta de <i>Y. lipolytica</i> al daño oxidativo después del pre-tratamiento con cafeína durante 12 h	51
Figura 15. Cafeína como posible agente antagonico del daño oxidativo en <i>Y. lipolytica</i>	53
Figura 16. Disminución del crecimiento de las cepas de <i>Y. lipolytica</i> en presencia de cafeína como agente antioxidante	55



## NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin Monofosfato cíclico
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
ATR	Ataxia Telangiectasia y proteína relacionada con Rad3
°C	Grados Celsius
Cdk	Quinasa dependientes de ciclina
CFR	Código Federal de Regulaciones E. U. A.
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfatados
DSB	Ruptura de doble cadena
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
<i>et al.</i>	" <i>et alteri</i> " (y otros)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos
g	Gramos
h	Horas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HR	Recombinación Homóloga
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
kg	Kilogramo
L	Litro
lb/pulg <sup>2</sup>	Libras por pulgada cuadrada
mg	Miligramo
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar

$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{l}$	Microlitros
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos
ng	Nanogramos
NHEJ	Recombinación de extremos no homólogos
nm	Nanómetros
$\text{O}_2$	Oxígeno molecular
$\text{OCH}_3$	Metoxilo
OD	Densidad óptica
$\text{OD}_{600}$	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
OH	Hidróxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
$\text{OOCH}_3$	Metil peróxido
OOH	Hidroperóxido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
pH	Potencial de hidrógeno
Pm	Peso molecular
RAF	Formación de aducto de radicales
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
TAE	Tris, acetato y EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
U/ $\mu\text{l}$	Unidades por microlitro
UV	Ultravioleta
YPD	Extracto de levadura, peptona, dextrosa

## 1. RESUMEN

El ADN se encuentra sometido a constantes agresiones ambientales externas e internas, como la exposición a productos químicos, rayos UV o subproductos del metabolismo, por lo que el estudio de compuestos capaces de impedir o aminorar los daños al ADN es un área que ha cobrado gran interés en los últimos años. La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas consumido aproximadamente por el 80% de la población mundial a través de diversos productos. Se ha sugerido que la cafeína: 1) posee actividad antioxidante protegiendo a las células del efecto causado por especies reactivas de oxígeno, 2) puede causar daño al ADN o inhibir la función de los complejos participantes en los mecanismos de reparación del ADN; sin embargo, estos dos procesos propuestos para la cafeína, no han sido clarificados. El objetivo de este trabajo fue: determinar el efecto genotóxico o antioxidante de la cafeína en cepas de *Yarrowia lipolytica* deficientes en los mecanismos de reparación del daño al ADN. Para ello, en una primera fase cualitativa se probó por el método de dilución en placa, el efecto de diferentes concentraciones de cafeína (0.1-10 mM) y de peróxido de hidrógeno (1-10 mM) sobre el crecimiento de la cepa parental P01A y de las cepas mutantes  $\Delta rad52$  y  $\Delta ku80$  de *Y. lipolytica* (deficientes en mecanismos de reparación del ADN). En la segunda fase (análisis cuantitativo), se realizaron curvas de crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* por medio del monitoreo a diferentes tiempos de la  $OD_{600}$  de los cultivos adicionados con cafeína y/o  $H_2O_2$  (5 mM); se determinaron y compararon los tiempos de duplicación de los cultivos adicionados con cafeína con los adicionados con el agente donador de radicales libres; también se comparó la velocidad de crecimiento de las cepas mutantes con respecto a los de la cepa control (cepa parental P01A). La evaluación del efecto antioxidante de la cafeína se realizó calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento de las cepas P01A y de la mutante  $\Delta rad52$  pre-incubadas (3 y 12 h) con cafeína y posteriormente sometidas al efecto del  $H_2O_2$  (5 mM de cada uno). Las 3

cepas presentaron disminución del crecimiento cuando se sometieron al efecto de la cafeína y/o del peróxido. En las condiciones probadas (5 mM cafeína) se observa un efecto citotóxico de este compuesto sobre las tres cepas de *Y. lipolytica*; al ser este efecto más notorio sobre las cepas mutantes, indica que la cafeína podría tener un efecto genotóxico, similar al ocasionado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La pre-incubación con cafeína no tuvo efecto protector (antioxidante) que permitiese contrarrestar el efecto del agente donador de radicales OH. La acción inhibitoria de la cafeína (5 mM) sobre el crecimiento la mutante rad52, posiblemente se deba a que a esta concentración hay un arresto en la fase G2 del ciclo celular, donde la proteína rad52 es esencial para la reparación del ADN; al carecer de esta proteína, la cepa mutante se vio mayormente afectada en su velocidad de crecimiento. En base a las observaciones realizadas en este trabajo, se sugiere que la cafeína tiene un efecto genotóxico, aunque no se descarta que a concentraciones menores, la cafeína pudiese generar otro tipo de efectos similares a los descritos en la literatura.

## 2. INTRODUCCIÓN

La información genética contenida en el ADN se encuentra sometida a constantes agresiones ambientales externas e internas como la exposición a productos químicos, rayos UV o subproductos del metabolismo intracelular. Para contrarrestar estas agresiones, el núcleo celular cuenta con un mecanismo denominado “control del ciclo celular” cuyo objetivo es mantener vías de vigilancia durante la replicación del ADN para detectar de manera oportuna posibles errores, coordinar su reparación y asegurar que la información genética de la célula sea transferida de manera correcta a las generaciones posteriores.

El estudio de compuestos capaces de suprimir o impedir los daños al ADN ante la presencia de radicales libres es un área que ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a su relación con el envejecimiento celular y enfermedades crónico degenerativas.

La cafeína es consumida aproximadamente por el 80% de la población mundial diariamente a través de diversos productos (Ogawa & Ueki, 2007). La cafeína en el cuerpo humano, tiene un efecto antagonista de los receptores de adenosina en el cerebro y como consecuencia inhibe la liberación de dopamina y sus efectos promotores del sueño. En algunos estudios se ha llegado a sugerir que la cafeína posee actividad antioxidante protegiendo a diferentes tipos de células del efecto causado por especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS), mientras que en otros estudios se ha propuesto que la cafeína puede generar daño a la pared celular, interferir con el tráfico de proteínas intracelulares, propiciar arresto del ciclo celular y causar daño al ADN (Calvo *et al.* 2009).

## **2.1. Definición del problema**

La cafeína es un compuesto que pertenece al grupo de las xantinas (1,3,7-trimetilxantina), encontrado en más de 60 especies vegetales. Este compuesto ejerce efectos como la mejora del estado de ánimo, del estado de alerta (Kaplan *et al.*, 1997; Lorist & Tops, 2003), del rendimiento en el ejercicio (Doherty & Smith, 2004), la velocidad a la que se procesa la información mental, la sensibilización, la capacidad de atención y el tiempo de reacción del organismo. Entre los efectos benéficos que se le han atribuido a la cafeína también se encuentra la capacidad antioxidante al participar en la captura de ciertas especies reactivas de oxígeno (ROS) (León-Carmona & Galano, 2011), sin embargo, este efecto y otros como el daño al ADN aún no han sido clarificados. En este proyecto, se dispuso la utilización de un sistema de células eucariotas deficientes en los mecanismos de reparación del daño al ADN para determinar si la cafeína tiene efecto genotóxico o si desempeña un papel protector contra el daño por radicales libres.

## **2.2. Justificación**

La doble cadena de ADN es considerada una de las moléculas más susceptible al daño causado por agentes ambientales como contaminantes químicos, radiaciones ionizantes, metales pesados, subproductos del metabolismo y absorción de energía térmica (Sayre, Perry, & Smith, 2008).

La regulación de la expresión genética se lleva a cabo constantemente e integra a todos aquellos procesos por los cuales factores nucleares, citoplásmicos, o intercelulares influyen en el control celular incluyendo los mecanismos de reparación del daño al ADN. Diversos estudios se han centrado en la elucidación de los mecanismos moleculares y la identificación de productos naturales que eviten daños al ADN, sin embargo, son necesarios nuevos estudios *in vitro* con la finalidad de poder apreciar

plenamente el valor de estos compuestos en los procesos celulares y moleculares.

La cafeína es un compuesto ampliamente consumido en el mundo y sus efectos fisiológicos se encuentran ya descritos pero no existe suficiente evidencia respecto a los efectos antioxidante o genotóxico se le han atribuido. Debido a la controversia que existe sobre estos posibles efectos de la cafeína se elaboró el presente trabajo donde se incluyó como modelo de estudio dos cepas mutantes de la levadura *Y. lipolytica* ( $\Delta ku80$ ,  $\Delta rad52$ ) deficientes en la síntesis de complejos proteicos con importante participación en dos procesos de reparación de las rupturas de la doble cadena del ADN: la recombinación de extremos no homólogos y la recombinación homóloga. La susceptibilidad de estas cepas mutantes a sufrir daños en el ADN, permite comparar el efecto de la cafeína con el de otro agente de capacidad genotóxica conocida y evaluar si la cafeína confiere algún tipo de protección ante el daño con dicho agente.

### 3. HIPÓTESIS

La cafeína tiene efecto genotóxico en las cepas deficientes en los mecanismos de reparación del ADN de *Y. lipolytica*.

La cafeína tiene efecto protector (antioxidante) en las cepas deficientes en los mecanismos de reparación del ADN de *Y. lipolytica*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Determinar el efecto genotóxico o antioxidante de la cafeína en cepas de *Yarrowia lipolytica* deficientes en los mecanismos de reparación del daño al ADN.

### 4.2. Objetivos específicos

Evaluar el posible efecto genotóxico de la cafeína sobre las cepas mutantes ku80 y rad52 de *Y. lipolytica*.

Evaluar el posible efecto de la cafeína como agente protector del daño ocasionado por un agente donador de radicales OH<sup>•</sup> (peróxido de hidrógeno) sobre las cepas mutantes ku80 y rad52 de *Y. lipolytica*.



## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Historia y consumo de la cafeína

La cafeína se encuentra posicionada como una de las sustancias más consumidas en todo el mundo; está presente de manera natural en hojas, semillas o frutos de por lo menos 63 especies de plantas, como ejemplos de esto están los granos de café y de cacao, nueces de cola, bayas de guaraná, el té y la yerba mate (Heckman, Weil, & Gonzalez de Mejia, 2010).

La cafeína ha sido utilizada durante miles de años. Datos históricos sugieren que se consumía desde el año 2737 A.C., cuando el emperador chino Shen Nung preparó la primera taza de té al hervir un poco de agua con hojas de algunos arbustos (Arab & Blumberg, 2008). El consumo de cafeína a través del grano del café se originó en el siglo IX en Etiopía, cuando un pastor observó que sus cabras habían aumentado su energía después de ingerir unos granos de la planta del café (Griffin, 2006). En la actualidad, la cafeína se puede encontrar en bebidas, productos de repostería y en la industria farmacéutica en forma de medicamentos y suplementos dietéticos, aunque se consume con mayor frecuencia en forma de bebidas como el café (71%), refrescos (16%) y el té (12%) (Beverage Spectrum, 2008). Se estima que aproximadamente el 80% de la población mundial consume un producto con cafeína diariamente (Ogawa & Ueki, 2007), “En Estados Unidos, Canadá y países europeos como Finlandia, Dinamarca y Suiza, el consumo de café representa la mayor parte del consumo diario de cafeína en los adultos, mientras que en el Reino Unido el té es la bebida de elección” (Nawrot *et al.*, 2003). En países latinoamericanos no se cuenta con datos exactos acerca del consumo de cafeína, pero se cree que en países como Brasil y Argentina el consumo es alto debido al uso popular de café y yerba mate, situación similar a la de Japón a causa del consumo de té verde (Heckman *et al.*, 2010).

La cafeína es clasificada por la FDA como una sustancia de usos conocidos seguros y señala que el consumo moderado de cafeína no produce riesgos para la salud (21 CFR, sección 182.1180) (Somogyi, 2010).

## 5.2. Descripción de la cafeína

La cafeína es una molécula orgánica cuya nomenclatura química es 1, 3, 7-trimetilxantina (IUPAC); fue aislada del café en 1820 por el químico alemán, Friedlieb Ferdinan Runge como una xantina alcaloide cristalina blanca y amarga perteneciente a la familia de las metilxantinas en la que se incluyen compuestos como la teofilina y teobromina, con estructura química y efectos similares al de la cafeína en el organismo (Weinberg & Bealer, 2002). En la figura 1 se muestra la estructura química de la cafeína.

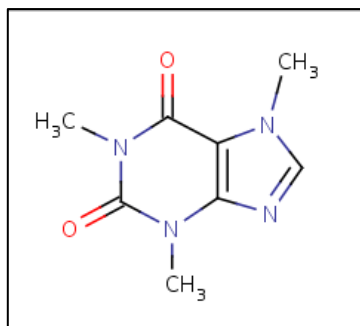


Figura 1. Estructura química de la cafeína (NCBI, 2004).

## 5.3. Propiedades de la cafeína

La cafeína en estado puro a temperatura ambiente es un sólido cristalino, blanco, inodoro, de sabor amargo en forma de agujas blancas o polvo. Tiene una densidad de 1.23 g/ml y un punto de fusión de 238°C, sublima a 176°C sin descomposición y cristaliza en forma de prismas hexagonales (O'Neil, 2006). Es soluble en agua pero tiene más afinidad por disolventes orgánicos como el cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y

acetona ( $C_3H_6O$ ). La solubilidad de la cafeína en agua puede incrementarse adicionando benzoatos alcalinos, cinamatos, citratos o salicilatos, pero su reacción con ácidos da lugar a compuestos muy inestables (OMS, 1991). En solución, 1 g de cafeína/100 ml de agua alcanza un pH de 6.9.

#### **5.4. Metabolismo de la cafeína**

La cafeína es rápida y completamente absorbida por el tracto gastrointestinal de humanos y de animales de laboratorio (Magkos & Kavouras, 2005). En personas sanas, el tiempo de vaciado gástrico de la cafeína es de 50 a 175 min y el tiempo de eliminación es en promedio 5 h (Charles *et al.*, 2008); el 50% se elimina en 1 a 2 h y en 3.5 h más del 90%. La tasa de absorción de la cafeína está estrechamente relacionada con el vaciamiento gástrico (Higaki *et al.*, 2008), por lo que se asume que tiene una biodisponibilidad del 100% (Blanchard & Sawers, 1983). Con el consumo de 1 taza de café, aproximadamente el 90% de la cafeína contenida se elimina del estómago en 20 min y su concentración plasmática máxima se alcanza en 1 a 1.5 h (Chvasta & Cooke, 1971), después es distribuida por el torrente sanguíneo y es metabolizada en el hígado (Nawrot *et al.*, 2003).

#### **5.5. Efectos fisiológicos de la cafeína en el ser humano**

La cafeína ejerce diversos efectos en el cuerpo humano. El doble anillo que posee en su estructura molecular, le confiere una forma similar a la adenosina (importante neuromodulador del sistema nervioso central) lo cual le permite actuar como su antagonista en los receptores de ésta en el cerebro y como consecuencia inhibir la liberación de dopamina y sus efectos promotores del sueño (Fisone, Borgkvist, & Usiello, 2004; Ferre, 2008). Numerosos estudios sustentan la capacidad de la cafeína para mejorar el estado de ánimo, el estado de alerta (Kaplan *et al.*, 1997; Lorist & Tops, 2003), el rendimiento en el ejercicio (Doherty & Smith, 2004), la velocidad a

la que se procesa la información mental, la sensibilización, la capacidad de atención y el tiempo de reacción del organismo (Cysneiros, Farkas, Harmatz, Von Moltke, & Greenblatt, 2007). Además, se ha sugerido que la cafeína puede contribuir a la reducción de los síntomas asociados con la enfermedad de Parkinson (Blandini, Nappi, Tassorelli, & Martignoni, 2000; Trevitt, Kawa, Jalali, & Larsen, 2009).

También se ha sugerido que el consumo de cafeína contenida en el té verde y suplementos contribuye a la reducción del peso corporal (Kovacs, Lejeune, Nijs, & Westerterp-Plantenga, 2004; Westerterp-Plantenga, Lejeune, & Kovacs, 2005; Greenberg, Boozer, & Geliebter, 2006; Turk *et al.*, 2009), y otros estudios han demostrado su papel en el aumento de la tasa metabólica, el gasto energético, la oxidación de lípidos, actividad lipolítica y termogénica (Acheson *et al.*, 2004; Ballard, Halaweish, Stevermer, Agrawal, & Vukovich, 2006; Dallas, Gerbi, Tenca, Juchaux, & Bernard, 2008). Un posible mecanismo que podría explicar el efecto termogénico de la cafeína es la inhibición de la enzima fosfodiesterasa (PDE) para la conversión del AMPc (Adenosin Monofosfato Cíclico) que participa como segundo mensajero y el antagonismo de los receptores de adenosina, proceso que limita el aumento de la liberación de noradrenalina (Westerterp-Plantenga, Diepvens, Joosen, Berube-Parent, & Tremblay 2006). Aun así, el efecto de la cafeína en la reducción de peso a través del consumo de té verde debe ser interpretado con cautela, ya que este efecto se ha reportado en individuos con ingesta de cafeína originalmente baja (<300 mg/día) (Kovacs *et al.*, 2004).

Van Dam y Hu (2005) encontraron que quienes han tenido un consumo de al menos 6 tazas de café por día tienen un 35% menos riesgo de padecer diabetes mellitus en comparación a los que toman solo dos tazas por día; sin embargo, ellos indican que a pesar de estos hallazgos aún no hay suficiente información disponible para hacer su recomendación.

Con respecto a la enfermedad cardiovascular, la relación entre el consumo de cafeína y esta patología aún no es clara pues los resultados que se encuentran en la literatura son inconsistentes, por lo que es necesaria más investigación en esta área (Cornelis & El-Sohemy, 2007).

Por otra parte, se ha mencionado que la cantidad necesaria para propiciar un efecto negativo en el organismo es distinta entre individuos dependiendo de su peso y sensibilidad a la cafeína. Se han reportado efectos adversos del consumo excesivo de cafeína a través de medicamentos con cafeína y no a través de alimentos y/o bebidas (Higdon & Frei 2006).

Ante sobredosis agudas de cafeína pueden presentarse síntomas como: temblores, taquicardia, inquietud, ansiedad, insomnio (Reissig, Strain, & Griffiths, 2009), hipertensión, diuresis, náuseas, vómitos, hipopotasemia, acidosis metabólica y convulsiones (Flanagan, Braithwaite, Brown, Widdop, & de Wolff, 1995).

## **5.6. Cafeína y efecto antioxidante**

El desequilibrio entre la producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno, ROS ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{OOH}^\bullet$ ,  $\text{OCH}_3^\bullet$ ,  $\text{OOCH}_3^\bullet$ , y  $\text{O}_2^\bullet$ ), causa estrés oxidativo (Harman, 1981) propiciando daños moleculares que comprometen la seguridad celular (Halliwell & Gutteridge, 2007). La acumulación de ROS en diferentes tipos de células eucariotas (incluidas las levaduras) es ocasionada tanto por la acumulación de productos de la respiración celular (en la mitocondria) como por estímulos ambientales (Perrone, Tan, & Dawes, 2008). Cuando la condición de estrés oxidativo es detectada por la célula, se promueve la activación de factores de transcripción para la síntesis de defensas antioxidantes (Gasch, *et al.*, 2000; Temple, Perrone & Dawes, 2005) que contribuyen con la restauración del equilibrio redox celular y la reparación de las biomoléculas oxidadas (Costa & Moradas-Ferreira, 2001).

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) son moléculas que pueden participar en la señalización celular en mamíferos (Sundaresan *et al.*, 1995), plantas (Vergara, Parada, Rubio, & Pérez, 2012) y levaduras (Bienert, Schjoerring, & Jahn, 2006; Bartosz, 2009), tienen la capacidad de recorrer largas distancias y penetrar en las membranas biológicas, lo que les permite generar un daño oxidativo (Saran & Bors, 1991).

En *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, el  $H_2O_2$  funciona como activador de los factores de transcripción que regulan la expresión de agentes enzimáticos antioxidantes (como la glutatión peroxidasa) (Delaunay, Isnard, & Toledano, 2000; Delaunay, Pflieger, Barrault, Vinh, & Toledano, 2002).

En estudios recientes se ha sugerido que la cafeína posee actividad antioxidante confiriendo protección contra el desarrollo de enfermedades como el Alzheimer (Rosso, Mossey, & Lippa, 2008; Chen, Ghribi, & Geiger, 2010; Prasanthi *et al.*, 2010.) y el daño ocular ocasionado por el envejecimiento (Varma & Hegde, 2010a).

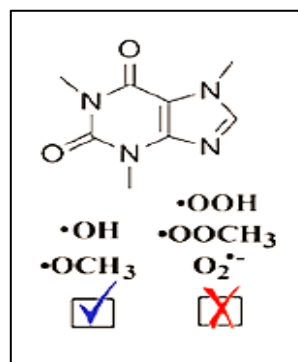
Por otra parte, también se ha descrito que la cafeína puede tener actividad similar a la de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (Zechmann *et al.*, 2011) y el ácido ascórbico (Lee, 2000; Devasagayam, Kamat, Mohan, & Kesavan, 1996).

En estudios sobre la capacidad de la cafeína para formar complejos con sustancias mutagénicas se ha encontrado que la cafeína puede participar como agente de asociación disminuyendo el número de compuestos aromáticos disponibles en el medio para unirse con el ADN (Davies, Veselkov, Evstigneev, & Veselkov, 2001).

Cuando la cafeína se somete a reacción con los radicales  $OOCH_3^\bullet$  (Metil peroxil) y  $O_2^\bullet$  (oxígeno molecular) se suscitan reacciones endergónicas, es decir, no ocurren de manera espontánea, por lo que se ha concluido que

la habilidad de la cafeína por la captura de este tipo de ROS no es eficiente (fig. 2). Las reacciones con cafeína, consideradas como las más exergónicas han sido las obtenidas ante el radical  $\text{OH}^\bullet$  (Hidroxido), por lo que se propone una alta capacidad antioxidante de la cafeína mediante la unión a radicales  $\text{OH}^\bullet$ , proceso denominado Formación de aductos de radicales (RAF; Radical Adduct Formation) (León-Carmona & Galano, 2011). Sin embargo, la facultad de la cafeína para capturar cierto tipo de ROS está relacionada a la concentración en que sea utilizada (Vignoli, Bassoli, & Benassi, 2011).

En humanos, la modulación de la respuesta inmune en el tratamiento del cáncer y la disminución del efecto tóxico causado por los agentes quimioterapéuticos se ha asociado a concentraciones plasmáticas de cafeína entre 1-50  $\mu\text{M}$  (Sabisz & Skladanowski, 2008).



**Figura 2. Capacidad antioxidante de la cafeína ante especies reactivas de oxígeno (ROS) (León-Carmona & Galano, 2011).**

En estudios *in vitro* del cristalino de ratón incubado con 0.1 mM de complejos de hierro y 5 mM de cafeína, también se destacó la participación de la cafeína en la supresión de radicales  $\text{OH}^\bullet$  (Varma & Hegde, 2010b).

La modulación de agentes antioxidantes también ha sido analizada en un estudio sobre el cerebro de ratas Wistar machos sometidas a dietas con suplementación de cafeína (20 a 40 mg/kg/día) por un lapso de 80 semanas, donde fue posible identificar que el consumo crónico de cafeína disminuyó la peroxidación de los lípidos de las membranas celulares y que aumentó la

concentración de glutatión (potente antioxidante endógeno), así como la actividad de dos enzimas antioxidantes (glutatión reductasa y superóxidodismutasa) proponiendo que el consumo de cafeína posee un efecto protector al modular el daño oxidativo (Abreu, Silva-Oliveira, Moraes, Pereira, & Moraes-Santos, 2011).

El aspecto aterogénico de la cafeína se ha evaluado a través de intervenciones en células del músculo de la aorta de ratones susceptibles a aterosclerosis en las que encontraron que 250  $\mu\text{M}$  y 2.5 mM de cafeína *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, regulan la proliferación celular y la apoptosis después de daño en el ADN y que a una concentración 100  $\mu\text{M}$ , este compuesto es capaz de inhibir especies reactivas de oxígeno (Mercer, Gray, Figg, Kumar, & Bennett, 2012).

### **5.7. Daño al ADN**

Desde hace décadas se sabe que los ácidos nucleicos (ADN) son susceptibles a sufrir daños por exposición a factores ambientales exógenos como contaminantes químicos, radiaciones ionizantes, metales pesados, componentes de alimentos y factores internos como la absorción de energía térmica y productos resultantes del estrés oxidativo (Lindahl, 1993). Entre los daños ocasionados al ADN se incluyen la formación de dímeros, pérdida de bases nitrogenadas, rupturas de cadena simple o doble, reposicionamiento de una base nitrogenada y entrecruzamientos. Como consecuencia de la pérdida de información genética pueden presentarse mutaciones en el ADN que pueden comprometer la integridad del genoma y la supervivencia celular (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).

Las mutaciones inducidas por especies reactivas de oxígeno se han asociado con el desarrollo de patologías como el cáncer (Ames, Gold, & Willett, 1995) y el envejecimiento (Burhans & Weinberger, 2012). A pesar de que la célula cuenta con mecanismos de restablecimiento del daño



ocasionado por estrés oxidativo, cuando la presencia de ROS es elevada y supera su acción, es posible que algunas moléculas permanezcan severamente oxidadas y lleguen a ocasionar daños irreparables en las proteínas y mitocondrias, lo que conduce a una muerte celular. En *S. cerevisiae* se distinguen 2 mecanismos que facilitan la eliminación de biomoléculas que sufren daños irreparables: el sistema de proteasoma dependiente de ubiquitina y la autofagia.

- a) El sistema de proteasoma dependiente de ubiquitina, es un mecanismo altamente conservado para la degradación de proteínas oxidadas específicas, aunque su mecanismo de acción exacto aún no es claro.
- b) La autofagia, es un mecanismo de degradación intracelular y reciclado de biomoléculas y organelos llevado a cabo por lisosomas (en células de mamífero) o vacuolas (en levaduras) (Klionsky *et al.*, 2010). Para que esta vía se active se expresan genes relacionados con la autofagia (33 en la levadura) y otros homólogos (en mamíferos) (Reggiori & Klionsky, 2002; Goldman, Taylor, Zhang, & Jin, 2010). La autofagia es considerada como un proceso de supervivencia altamente conservado entre los eucariotas como respuesta al estrés causado por la falta de nutrientes y la acumulación de ROS (Kissová *et al.*, 2007; Bhatia-Kissová & Camougrand, 2010).

Cuando la levadura es expuesta a prolongadas o repentinas dosis nocivas de ROS, la respuesta normal al estrés oxidativo es interrumpida (Salmon, Evert, Song, & Doetsch, 2004), los sistemas de defensa antioxidante fallan y se provoca el inicio de la muerte celular programada de la que se identifican dos vías:

1. La apoptosis, es un proceso inducido por exposición a bajas concentraciones de  $H_2O_2$ , estimula la producción de metacaspasas con actividad proteolítica.

2. La necrosis, es inducida por fallas bioenergéticas o en la morfología celular, como la fragmentación del ADN al azar, un aumento en el volumen celular o de los organelos, la pérdida de integridad de la membrana de células plasmáticas o la fuga del contenido intracelular.

En levaduras, la necrosis puede ser generada por exposición a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ácido acético y metales pesados (Zong & Thompson, 2006).

## **5.8. Mecanismos de reparación del ADN**

Debido a que es esencial que la información genética contenida en el ADN se transmita sin alteraciones o daños, la célula cuenta con mecanismos de reparación que evitan, detectan y corrigen pérdidas de información en el material genético.

### **5.8.1. La reparación de escisión de nucleótidos**

La reparación de escisión de nucleótidos (NER), es un mecanismo que se encarga de cortar y remover lesiones o fragmentos completos incorrectos en las secuencias de ADN. En este proceso participan enzimas que detectan las secciones incorrectas de ADN, ejerciendo diferentes funciones: abren la doble cadena (helicadas), cortan el fragmento dañado (endonucleasas), sintetizan la secuencia de ADN correcta (polimerasas) y unen los nuevos nucleótidos (ligasas). La reparación de escisión de nucleótidos puede ocurrir mediante dos vías: la vía acoplada a la transcripción, es aquella en la que los genes en transcripción son reparados simultáneamente, y la vía genómica global, encargada de la reparación del resto del genoma pero de manera más lenta y menos eficiente (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).

### **5.8.2. Reparación de escisión de bases**

Este mecanismo de reparación consiste en el escaneo de la doble hélice de ADN realizado por glucosidasas de ADN que comparan el

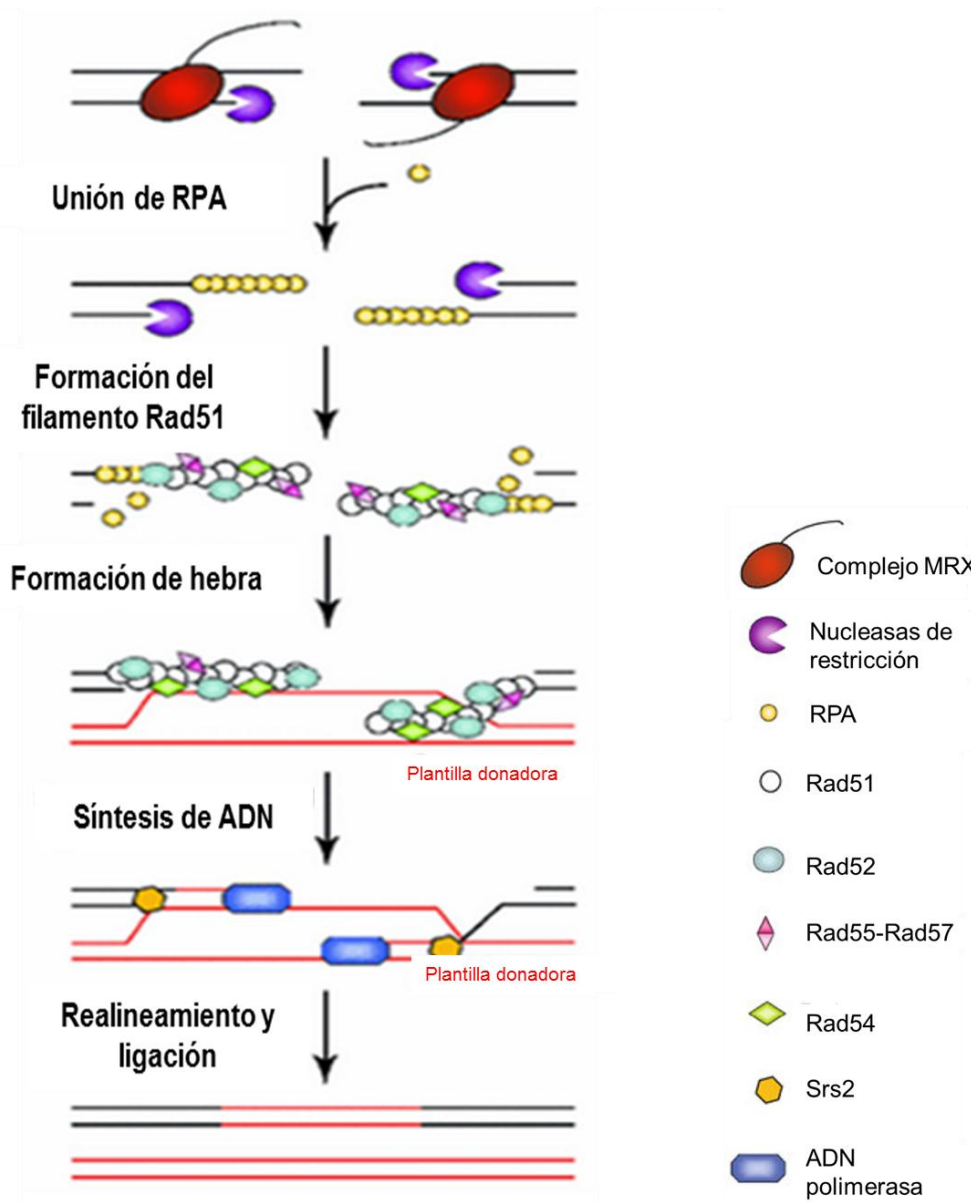
apareamiento correcto de bases y rompen sus enlaces glucosídicos en caso de encontrarse apareadas de manera incorrecta. Después del rompimiento de enlaces por esta causa, intervienen endonucleasas y polimerasas de ADN que cortan la parte del esqueleto dañado y eliminan cualquier remanente. Cuando las bases son eliminadas por completo entran en marcha polimerasas  $\beta$  que inserta nucleótidos complementarios y ligasas III encargadas de sellarlos a la doble cadena (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).

Otro tipo de lesión que puede sufrir el ADN son las rupturas de doble cadena (Double-Strand Break, DSB) que después de ser ocasionadas son detectadas por puntos de reparación (Harrison & Haber, 2006). Los principales reguladores del ciclo de control celular son una familia de cinasas serina/treonina conocidas como quinasas dependientes de ciclina (Cdk), las cuales determinan el mecanismo de reparación que entrará en acción después de una ruptura de la doble cadena (Ubersax *et al.*, 2003; Holt *et al.*, 2009).

### **5.8.3. Recombinación homóloga**

La recombinación homóloga (Homologous Recombination, HR) es un tipo de reparación de rupturas de la doble cadena del ADN que se lleva a cabo durante la primera división meiótica (fases S/G2) cuando la actividad de Cdk es alta y existe una plantilla de reparación disponible (la cromátida hermana). Este tipo de reparación constituye un mecanismo clave y vía de tolerancia de daños en el ADN para asegurar una segregación cromosómica precisa, sin embargo, pueden suscitarse defectos en la recombinación que conducen a la inestabilidad genómica y a una predisposición elevada de cáncer, ocasionada principalmente por reordenamientos del genoma como extremos no deseados (translocación, deleción, inversión) y la acumulación de intermediarios tóxicos de la recombinación. En este modelo de reparación (fig. 3) después de la ruptura de la doble hélice algunas enzimas de procesamiento de la DSB como la Sae2 (endonucleasa) y el complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) se encargan de la eliminación del ADN dañado;

después, se lleva a cabo otro proceso de resección catalizado por los compuestos protéicos Exo1 y/o Dna2 en colaboración con Sgs1; posteriormente, la proteína RPA (Proteína de Replicación A) se une a los extremos de la cadena de ADN y sirve como sustrato para la formación del filamento llamado Rad51 que es rodeado por el complejo Rad52, Rad55-Rad57 y Rad54, el cual constituye el molde para la síntesis del fragmento de la cadena que sufrió la ruptura (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).



**Figura 3. Mecanismo de reparación del ADN por recombinación homóloga (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).**

#### 5.8.4. Recombinación de extremos no homólogos

El mecanismo de Recombinación de extremos no homólogos (Non Homologous End Joining, NHEJ) es la principal vía de reparación de las rupturas de la doble cadena del ADN (fig. 4). Este tipo de reparación ocurre durante la fase G1 del ciclo celular cuando los niveles de Cdk son bajos y las DSB son identificadas por los complejos protéicos de reparación Ku (yKu70/yKu80) y MRX (Mre11-Rad50-Xrs2) que son unidos a los extremos de cada cadena de ADN desacoplada. El complejo Ku que normalmente se localiza en los telómeros, se traslada al sitio de la DSB y sostiene los extremos de cada cadena de ADN para detener la resección de bases, mantenerlos correctamente alineados y proporcionar una ventana de oportunidades para la reparación por la vía NHEJ. Después de estabilizar la doble cadena de ADN, el complejo de ligasas Dnl4-Lif1-Nej1 es reclutado para que los extremos terminales de ADN rotos sean ligados y la lesión quede reparada (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).

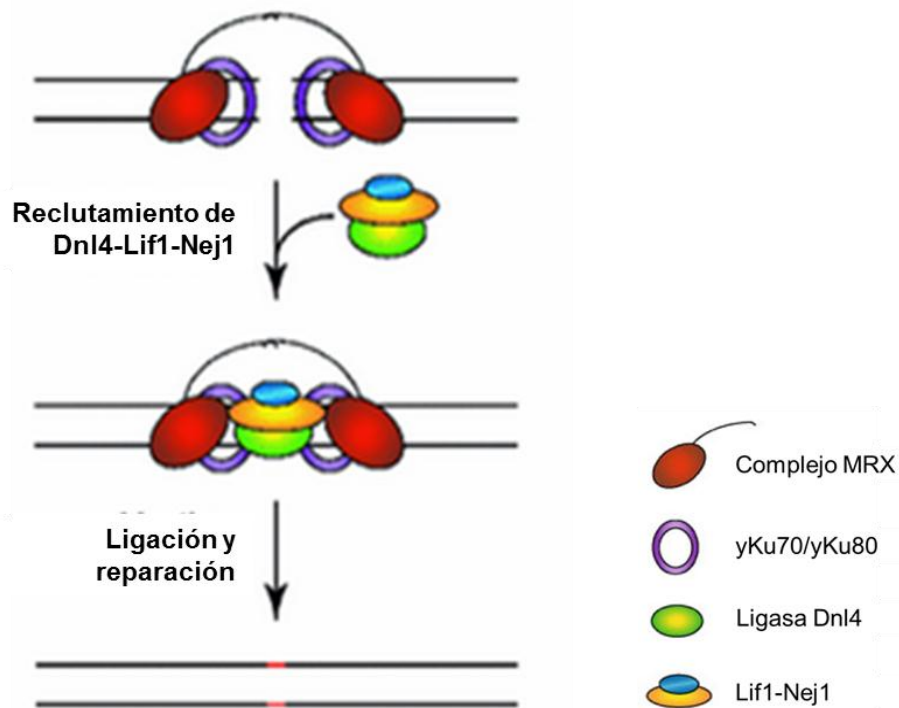


Figura 4. Mecanismo de reparación del ADN: unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).

La recombinación homóloga (HR) y la recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) son procesos de reparación de la DSB altamente conservados tanto en humanos como en levaduras. De los diversos tipos de lesión del ADN, la ruptura de la doble cadena (DSB) es la forma más citotóxica pues amenazan la viabilidad celular, este tipo de daños es ocasionado por radiación ionizante, agentes químicos, estrés oxidativo y horquillas de replicación colapsadas (Finn, Lowndes, & Grenon, 2012).

### **5.9. ADN y cafeína**

Además de los efectos benéficos que se le han atribuido a la cafeína, también se ha descrito por algunos autores que la cafeína puede causar daño celular enfocado su participación como un agente inhibidor de las partículas participantes en la señalización celular y como agente causante daño al ADN potenciando el efecto dañino de otros agentes.

En ensayos con células linfoblásticas humanas con tratamiento de cafeína por 2 h, se encontró que a una concentración 10 mM, la cafeína es capaz de inhibir enzimas (ATM, Ataxia Telangiectasia Mutada; ATR, Ataxia Telangiectasia y proteína relacionada con Rad3) que participan como sensores de la detección de daños al ADN generados principalmente por factores oxidantes (Block, Merkle, Meek, & Lees-Miller, 2004).

En 2004, Wang y colaboradores encontraron que la cafeína (2 mM) no generó deleciones simples en el ADN en células ováricas de hámster, sin embargo detectaron que la activación de la proteína Rad51 disminuyó cuando las células fueron tratadas con cafeína 4 mM al ser o no sometidas a la exposición de rayos X, por lo que propusieron que la cafeína podría tener un efecto inhibitorio de la reparación de extremos homólogos mediante la inhibición de las cinasas ATM y ATR (relacionadas al sensado del daño al ADN).

En otros ensayos realizados con células provenientes de carcinoma de tiroides modificadas en las cascadas de señalización de apoptosis celular, después de ser sometidas a preparaciones con cafeína (2 mM) durante lapsos de 1 a 4 h y ante la presencia de agentes como el cisplatino (quimioterapéutico) o radiaciones UV, se demostró que la cafeína puede inhibir la proliferación celular, especialmente tras ser sometidos a la exposición a rayos UV (Deplanque *et al.*, 2004).

Por otra parte, en queratinocitos sometidos a concentraciones de 1 a 4 mM de cafeína durante una hora y a la exposición a rayos UV, se encontró que la apoptosis aumentó únicamente cuando las células tratadas con cafeína se sometieron a los rayos UV (Han, Ming, & He, 2011).

#### **5.10. La levadura como modelo de estudio**

La levadura eucariota *S. cerevisiae*, es un organismo modelo bien caracterizado y versátil que ha sido clave en estudios relacionados con el control del ciclo celular y el daño al ADN (Bartek, & Lukas, 2007; Harper, & Elledge, 2007; Clemenson, & Marsolier-Kergoat, 2009).

*Yarrowia lipolytica* es una levadura identificada por David Yarrow en el Delft Microbiology Laboratory (1972), lleva el nombre de la especie lipolytica debido a su capacidad para hidrolizar lípidos. Es una especie de levadura, aerobia no patógena, heterotámica, que es capaz de emplear grasas e hidrocarburos como fuente de carbono para su crecimiento. La morfología de este organismo depende de las condiciones del medio y las bases genéticas con las que cuenta cada cepa; es capaz de sufrir transición a hifa por sustitución de glucosa con N-acetilglucosamina o añadiendo suero al medio de cultivo (capaz de diferenciarse en pseudomicelio y verdadero micelio dependiendo de las condiciones a las que se le someta) (Pérez-Campo & Domínguez, 2001). Por éstas y otras características fisiológicas,

metabólicas y genómicas *Y. lipolytica* ha sido empleada como modelo celular para diferentes estudios en los últimos años (Nicaud, 2012).

La participación de complejos protéicos en mecanismos como la recombinación homóloga, se han reportado en ensayos con la levadura *Y. lipolytica*, donde se ha identificado la importancia del gen RAD52 en la reparación del ADN en presencia de agentes oxidantes (Campos-Góngora, Andaluz, Bellido, Ruiz-Herrera, & Larriba, 2013). Otro reporte de *Y. lipolytica*, mediante la creación de células mutantes deficientes en los genes KU70 y KU80, implicados en la formación del heterodímero Ku80-Ku70 sugiere que esta especie utiliza como principal vía de reparación del ADN la Recombinación de Extremos no Homólogos (NHEJ) (Verbeke, Beopoulos, & Nicaud, 2013).



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material químico

Los reactivos utilizados para el presente trabajo fueron: oligonucleótidos (Alpha DNA); cafeína, etanol (Bio Basic Canada Inc.); Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, marcador de talla molecular Hyperladder III (Bioline); fenol (CTR Scientific); peptona y agar (Dibico); agarosa, bromuro de etidio, tris, acetato, EDTA (Bio-Rad); peróxido de hidrógeno, cloroformo (Jalmek); glucosa (Sigma) y extracto de levadura (USBiological).

### 6.2. Material biológico

Las cepas de *Y. lipolytica* utilizadas en este estudio fueron: la cepa parental P01A (LEU<sup>-</sup>, URA<sup>-</sup>) y las cepas mutantes  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  generadas por delección de los genes KU80 y RAD52, respectivamente, en el Laboratorio de Diferenciación de Hongos del Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV, Unidad Irapuato, (para una referencia de la mutante Rad52, ver: Campos-Góngora *et al.*, 2013).

### 6.3. Métodos

#### 6.3.1. Diseño del estudio

Este es un estudio de tipo experimental, prospectivo, longitudinal y analítico que se realizó de julio de 2013 a julio de 2014 empleando como modelo de estudio al hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*. Las cepas de estudio fueron la cepa parental P01A (LEU<sup>-</sup>, URA<sup>-</sup>) y las cepas mutantes  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$ ; carentes de genes que codifican para proteínas que participan en procesos de reparación del ADN en células eucariotas (recombinación de extremos no homólogos y recombinación de extremos homólogos, respectivamente). Para el análisis entre las cepas se consideró

como el grupo control a la cepa P01A y para el análisis entre tratamientos se tomaron como controles a los cultivos en medio YPD sin adición de algún agente. Para cada experimento, se hicieron pre-cultivos de las cepas de *Y. lipolytica* para lograr que las células estuviesen en su fase de crecimiento exponencial (de las 4 a 24 h de incubación). Para la determinación del posible efecto genotóxico y/o antioxidante de la cafeína se analizó el crecimiento de *Y. lipolytica* por medio de curvas de crecimiento mediante la determinación de la OD<sub>600</sub> de cultivos en presencia de cafeína y peróxido de hidrógeno. Con los datos obtenidos se determinaron los tiempos de duplicación de cada cepa sometida a los diferentes tratamientos y éstos se compararon para establecer las posibles diferencias. Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores obtenidos se capturaron y analizaron con el software SPSS V.17.0 (SPSS, Inc. Chicago Illinois, EE. UU.).

La parte experimental se realizó en los laboratorios de Proteómica, Genética y Biología Molecular, Bioquímica Nutricional, y de Alimentos en el Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

### **6.3.2. Estrategia general**

El desarrollo del presente trabajo se basó en la evaluación del efecto de la cafeína sobre el crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica* en tres etapas principales:

1. Comprobación de la autenticidad de las cepas de *Y. lipolytica* por medio de análisis genotípico.
2. Análisis cualitativo por dilución en placa para determinar las concentraciones de cafeína y del agente oxidante (peróxido de hidrógeno) a utilizar en el análisis cuantitativo.

3. Análisis cuantitativo para determinar el efecto de los agentes cafeína y/o peróxido de hidrógeno sobre la velocidad de crecimiento de *Y. lipolytica* (P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$ ).

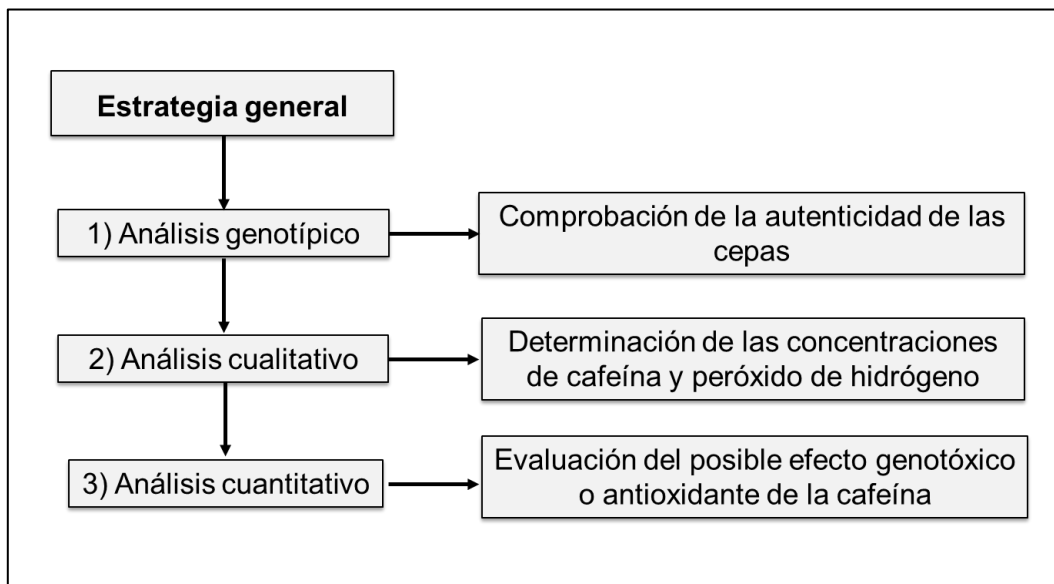


Figura 5. Estrategia general del trabajo.

### 6.3.3. Preparación de medios de cultivo

Para el cultivo de las cepas de *Y. lipolytica* se utilizó el medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de caseína, 2% de glucosa anhidra). Se preparó disolviendo 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona de caseína y 20 g glucosa anhidra en agua desionizada, se aforó a 1 L y se esterilizó por calor húmedo en autoclave (121°C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 15 min). Para la preparación de YPD sólido, además de los compuestos mencionados se adicionó el 2% de agar bacteriológico.

#### **6.3.4. Solución stock de cafeína**

La solución stock de cafeína se preparó a concentración 0.5 M. Se disolvieron 0.2923 g de cafeína ultra pura (Pm: 194.19 g) con 3 ml de agua desionizada previamente calentada a 80°C. La solución de cafeína se esterilizó por filtración con membrana millipore desechable de 0.22 µm (Millex®-GP) y se almacenó en un tubo de polipropileno estéril de fondo cónico, a 4°C hasta su uso. Antes de la utilización de la solución stock de cafeína, ésta se disolvió calentándola en baño maría a 80°C. La cantidad de cafeína a utilizar se calculó considerando la concentración milimolar (mM) final deseada en el medio YPD por medio de una regla de 3 simple.

#### **6.3.5. Agente oxidante**

Como agente oxidante se utilizó peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Pm: 34.01 g/mol) al 50%. Para alcanzar las concentraciones requeridas se calculó la masa del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> multiplicando el valor de su densidad por el volumen adquirido (1 L) considerando el nivel de pureza (50%). Posteriormente se calculó la concentración molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contenido en 1 L para el cálculo de las concentraciones finales deseadas en el medio YPD.

#### **6.3.6. Cultivos celulares**

Se partió de cultivos de la colección del Laboratorio de Proteómica del CINSP, conservados en medio con glicerol a -20°C. Para la reactivación de las cepas se tomó una alícuota de estos cultivos y se sembraron en placas de petri con medio YPD, las placas se incubaron a 28°C durante toda la noche. Para los diferentes experimentos se tomó una colonia aislada de estas placas y se sembró en 20 ml de medio YPD en tubos de polipropileno de fondo cónico para los ensayos cualitativos y en 50 ml de YPD en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad para los ensayos cuantitativos. Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm) por 12 h en una

incubadora con sistema de agitación orbital (SL Shel Lab, modelo 1575). Para el mantenimiento de las cepas se hicieron resiembras periódicas (una vez por semana) en placas con medio YPD.

### **6.3.7. Extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN genómico se realizó por el método de Hoffman y Winston (1987), este método consiste en el rompimiento de la pared celular de las levaduras por medio del fraccionamiento mecánico con perlas de vidrio y posterior purificación con una mezcla de fenol-cloroformo para la obtención del ADN genómico.

A partir de cultivos en 20 ml de YPD incubados durante toda la noche a 28°C y 200 rpm, se tomaron aproximadamente 3 ml de cultivo y se centrifugaron (microcentrífuga Eppendorf 5415D) durante 5 min a 12000 rpm en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad. El sobrenadante se eliminó por decantación y las células recuperadas se resuspendieron en 100 µl de agua destilada, después, se adicionó 0.3 g de perlas de vidrio de 0.45 a 0.52 mm de diámetro, 400 µl de solución de lisis (Tritón 100X, SDS 1%, EDTA [1 mM], ClNa [100 mM], Tris HCl [10 mM] pH8) y 400 µl de una mezcla (50:50) de fenol-cloroformo e inmediatamente se sometieron a 4 periodos de agitación con vórtex (1 min) y permanencia estática a 4°C en hielo molido (1 min). Posteriormente los tubos se centrifugaron durante 10 min a 12000 rpm; la fase acuosa (aprox. 500 µl) se transfirió a un tubo nuevo y se le añadieron 50 µl de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol al 100% frío, para precipitar el ADN. Las muestras se mezclaron por inversión 3 veces y se incubaron a -20°C por 20 min, después se centrifugaron 10 min (12000 rpm) y el sobrenadante se eliminó por decantación. El pellet resultante de ADN se lavó agregando 500 µl de etanol al 70%, los tubos se centrifugaron por 2 min a 12000 rpm, el sobrenadante se eliminó por decantación y los restos de etanol se eliminaron por aspiración con una

micropipeta. Después, los tubos se dejaron abiertos a temperatura ambiente (TA) por 5 min, para que se evaporaran los restos de etanol; finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µl de agua estéril (PISA®) y los tubos se guardaron perfectamente etiquetados a -20 °C, hasta su uso.

### 6.3.8. Análisis Genotípico

La autenticidad y pureza de las cepas de estudio de *Y. lipolytica* se comprobó por amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de fragmentos específicos de ADN para cada cepa utilizando primers específicos que se describen en la tabla 1 (Campos-Góngora *et al.*, 2013). Cada reacción de PCR se preparó con los compuestos que se indican a continuación: 14 µl de agua bidestilada estéril, 5.0 µl de mezcla de deoxinucleótidos (dNTP's) [10 mM] con buffer para la enzima Taq polimerasa [10 mM], 2.0 µl del oligonucleótido forward [1µM], 2.0 µl del oligonucleótido reverse [1µM], 0.5 µl de la enzima Taq polimerasa Invitrogen® [5 U/µl], 0.5 µl cloruro de magnesio [50 mM] y 1 µl de ADN genómico [20-100 ng/ µl]. Los componentes de la reacción se agregaron a un tubo de polipropileno de 200 µl de capacidad.

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el ensayo de PCR para el análisis de la cepa  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica***

Primer	Secuencia de nucleótidos	Temp. de alineamiento (°C)	ADN genómico	Tamaño esperado (pb)
Ku-350 F	GGATACCAGCAGCACCAGCCTGG	66	P01A	(-)
URA3 Int R	GGCCTGCGAGCTGGTGCCGAGG		Ku 80	1673
Sonda KU80 F	GGGATTGGCGGAAAGAAGGAGCTTG	66	P01A	476
Sonda Ku80 R	GGAAGTAGCCGCGAATGGGTGG		Ku 80	(-)
Rad-150 F	GGTATGGGATGGGTTCCGACGGG	60	P01A	(-)
URA3 Int R	GGCCTGCGAGCTGGTGCCGAGG		Rad 52	1722

Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador PCR Sprint Thermal Cycler® (Thermo Electron Corporation), bajo las condiciones descritas en la tabla 2: desnaturalización inicial 95°C, 5 min; 30 ciclos de PCR que constan de desnaturalización a 95°C, 1 min; alineamiento (temperatura según par de oligonucleótidos), 1 min; extensión a 72°C, (tiempo según el tamaño del fragmento de interés); además de una extensión final a 72°C, 10 min y una última etapa de conservación a 4°C.

**Tabla 2. Condiciones de la reacción de PCR para el análisis genotípico de las cepas de *Y. lipolytica***

<b>Etapa</b>	<b>Fase</b>	<b>Temp. (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ciclos</b>
<b>1</b>	Desnaturalización	95	5 min	1
<b>2</b>	Desnaturalización	95	1 min	30
	Alineamiento	*	1 min	
	Extensión	72	**	
<b>3</b>	Extensión final	72	10 min	1
<b>4</b>	Conservación	4°C	Infinito	

\*ver temp. específica para cada par de oligonucleótidos.

\*\*dependiendo del tamaño del fragmento esperado: 1 min por cada 1000 pb.

### **6.3.9. Electroforesis en geles de agarosa**

La comprobación de los productos amplificados por PCR se hizo por medio de electroforesis en geles de agarosa. Para la preparación de los geles se pesó la agarosa en una balanza de precisión (Sartorius, BL 1500), se disolvió con buffer TAE 1X (40 mM Tris-Acetato y 1 mM EDTA; pH 8.0) en una placa de calentamiento (Corning Stirrer/Hot Plate), se tomaron 22 ml de agarosa en un tubo de polipropileno de fondo cónico y se le agregó 1 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml), se vació en un molde con peine de plástico para formar los pozos y se dejó gelificar; posteriormente se colocó en la cámara de electroforesis (BioRad®) y se cubrió con una solución 1X de

buffer TAE. Posteriormente, 10 µl de cada una de las muestras (productos de las reacciones de PCR) se mezclaron con 2 µl de buffer de carga Orange 6X (xileno FF cianol y naranja G) y se depositaron con ayuda de una micropipeta en cada uno de los pozos del gel. La electroforesis se realizó aplicando una corriente eléctrica de 80 V, durante 45 min con una fuente de poder Power-pac 300, (BioRad®) Las bandas separadas por electroforesis se identificaron en base al tamaño (número de nucleótidos) con ayuda del marcador de peso molecular HyperLadder III (Bioline). Una vez realizada la electroforesis, las bandas se visualizaron con luz UV, con ayuda del sistema de fotodocumentación GelDoc- It Imaging System (UVP).

### 6.3.10. Cálculo del inóculo para los experimentos

Las cantidades de *Y. lipolytica* necesarias para realizar los experimentos se obtuvieron a partir de cultivos líquidos incubados a 28°C con agitación orbital (200 rpm) durante 12 a 16 h, se tomó una alícuota de 1 ml de los cultivos y se realizaron diluciones con agua destilada para determinar la densidad óptica entre 0.1 y 0.4 a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Scientific, Evolution 300). La OD de cada cultivo se ajustó hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> final de 1.0 para las siembras por dilución en placa y de 0.1 para las siembras en líquido, según la fórmula que se muestra a continuación:

$$x = \frac{(Volumen\ final)(OD\ deseada)}{(OD\ total\ del\ cultivo)}$$

Para todos los ensayos realizados, la inoculación de los medios se realizó en condiciones de esterilidad utilizando una campana de flujo laminar (SterilGARD®III Advance).



### **6.3.11. Análisis cualitativo**

#### **6.3.11.1. Método de dilución en placa para la determinación de las concentraciones de cafeína y peróxido de hidrógeno**

Las concentraciones de cafeína y de peróxido de hidrógeno capaces de producir una disminución del crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* se determinaron a través de ensayos cualitativos por el método de dilución en placa (Johnson, Timmons, & Hall, 2002). Se comparó el crecimiento de la cepa parental y de las mutantes en medio YPD adicionado con distintas concentraciones de cafeína y peróxido de hidrógeno; se probaron concentraciones desde 0.1 hasta 10 mM. Para la preparación de las placas con cafeína y peróxido de hidrógeno se realizaron los cálculos necesarios para obtener las concentraciones finales deseadas en un volumen de 25 ml de YPD agar esterilizado utilizando la fórmula descrita en el apartado 6.3.3. Cada agente fue incorporado al medio YPD agar antes de alcanzar su temperatura de gelificación en un tubo de polipropileno de fondo cónico, se agitó suavemente para su completa homogenización y se vertió en la caja petri. Las diluciones seriadas 1:10 se prepararon de la siguiente manera: se partió de cultivos con una OD<sub>600</sub> ajustada a 1.0; de éste se tomaron 100 µl de cultivo y se transfirieron a un tubo para microcentrífuga que contenía 900 µl de agua destilada estéril, la mezcla se homogeneizó con ayuda de un vortex. Este proceso se repitió secuencialmente para preparar cada una de las diluciones (hasta 1x10<sup>-6</sup>). Para la siembra en placa, 3 µl de cada dilución se colocaron con ayuda de una pipeta sobre las placas de petri que contenían YPD adicionado con cafeína o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ya sembradas, las placas se incubaron a 28 °C, en posición invertida cubriéndolas con papel aluminio para protegerlas de la exposición a la luz. Para documentar el crecimiento de las colonias en los diferentes tratamientos, cada 24 h (durante 3-4 días) se tomó una fotografía de las placas y las imágenes se procesaron para su análisis.

### **6.3.12. Análisis cuantitativo**

En esta fase se comparó la velocidad de crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  realizando curvas de crecimiento por medio de la determinación de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm durante distintos tiempos de los cultivos. Estos experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se graficaron y analizaron utilizando los programas computacionales Excel y SPSS V.17.0. El análisis cuantitativo se dividió en 5 etapas que se describen a continuación:

#### **6.3.12.1. Crecimiento de *Y. lipolytica* en condiciones de incubación normales**

Para determinar el patrón de crecimiento de las 3 cepas de *Y. lipolytica* (P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$ ) cultivadas en condiciones normales (medio YPD sin agentes adicionados) e identificar las diferentes fases de la cinética de crecimiento, las cepas se sembraron en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad que contenían 50 ml de medio YPD, ajustando la cantidad de inóculo que permitiera tener una  $OD_{600}$  de 0.1. Los cultivos se incubaron a 28°C, con agitación rotatoria (200rpm) durante 72 h. El monitoreo del crecimiento de los cultivos se realizó a través de la lectura de la  $OD_{600}$  de una alícuota de 1 ml tomada cada 2 h durante las primeras 12 h, después cada 6 h hasta las 24 h y finalmente cada 24 h hasta las 72 h. Cuando fue necesario, para la determinación de la  $OD_{600}$  se realizaron diluciones con agua destilada para lograr lecturas dentro de un rango de absorbancia de 0.1 a 0.4.

#### **6.3.12.2. Evaluación del posible efecto genotóxico de la cafeína**

Para probar el posible efecto genotóxico de la cafeína se evaluó la velocidad de crecimiento de la cepa parental y las cepas mutantes de *Y. lipolytica* ante la presencia de cafeína y los resultados se compararon con los obtenidos de cultivos en presencia de  $H_2O_2$  (agente genotóxico

conocido). Para el cultivo de cada cepa se prepararon 2 matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad que contenían 50 ml de medio YPD; a uno se le añadieron 500  $\mu$ l de la solución Stock de cafeína y al otro 14.2  $\mu$ l de  $H_2O_2$ ; ambas cantidades eran suficientes para alcanzar una concentración 5 mM de cada uno de los agentes. Los cultivos se mantuvieron en incubación (28 °C, 200 rpm) y su crecimiento se monitoreó mediante la determinación de la OD<sub>600</sub> bajo las condiciones descritas en el apartado anterior cada 4 h durante las primeras 12 h y posteriormente a las 24, 36 y 48 h. Con los resultados obtenidos se calcularon los tiempos de duplicación como se describe en el apartado 6.12.4 y se realizó el análisis estadístico (apartado 6.12.5).

### **6.3.12.3. Evaluación del posible efecto antioxidante de la cafeína**

Para evaluar el posible efecto antioxidante de la cafeína, se probó a la cafeína como agente condicionante de la respuesta celular de *Y. lipolytica* ante el daño ocasionado por el agente oxidante  $H_2O_2$ . Basados en las observaciones del crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* en condiciones normales y con adición de cafeína o  $H_2O_2$ , en estos experimentos solo se incluyeron la cepa parental P01A y la  $\Delta$ rad52. Para cada cepa se dispusieron 6 matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 50 ml de medio YPD, dos de ellos se adicionaron con cafeína (concentración final 5 mM) otro con  $H_2O_2$  (5 mM) y los tres restantes se dejaron únicamente con medio YPD (ver tabla 3). Los medios se inocularon a una OD inicial de 0.1 y se incubaron a 28°C con agitación orbital (200 rpm). Después de un tiempo de incubación de 12 h, de cada cultivo se tomó una alícuota de 1 ml para la determinación de la OD<sub>600</sub>; a este tiempo (12 h) a los cultivos de cada cepa sin tratamiento (en medio YPD), se les adicionó 500  $\mu$ l de cafeína o 14.22  $\mu$ l de  $H_2O_2$  (cantidades necesarias para alcanzar una concentración de 5 mM). De la misma manera, a uno de los cultivos incubados únicamente con cafeína se le añadieron 14.22  $\mu$ l de  $H_2O_2$  y se continuó con las mismas condiciones de

incubación. Para el monitoreo del crecimiento de las cepas en las condiciones mencionadas (después de la adición del agente oxidante) se determinó la OD<sub>600</sub> a diferentes tiempos, las primeras 12 h se midió cada 3 h y posteriormente cada 12 h hasta las 72 h de incubación.

**Tabla 3. Tratamientos propuestos para evaluar el posible efecto antioxidante de *Y. lipolytica***

Cepas	Pre-tratamiento	Tratamiento posterior a 12 h de incubación
<b>P01A</b> <b><math>\Delta</math>rad52</b>	YPD	
	YPD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [5mM]
	YPD	Cafeína [5mM]
	YPD + Cafeína [5mM]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [5mM]
	YPD + Cafeína [5mM]	
	YPD + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [5mM]	

En otra serie de experimentos, se evaluó en condiciones similares el efecto antioxidante de la cafeína con un periodo de pre-incubación de los cultivos en presencia de cafeína solo por 3 h. En estos experimentos se incluyeron las tres cepas de *Y. lipolytica* (P01A,  $\Delta$ ku80 y  $\Delta$ rad52) y se agregó un cultivo de cada cepa adicionado con la mezcla simultánea de cafeína y peróxido de hidrógeno desde el inicio del cultivo.

#### **6.3.12.4. Determinación de los tiempos de duplicación celular**

El tiempo de duplicación de las células que crecen exponencialmente en cultivo líquido es considerado como un fenotipo útil para cuantificar la tasa de crecimiento. Para calcular el tiempo de duplicación de las cepas de *Y. lipolytica* se consideraron las lecturas de OD<sub>600</sub> en función del tiempo. Las determinaciones de la OD<sub>600</sub> se realizaron tomando alícuotas de 1 ml a diferentes tiempos post-inoculación y post-tratamiento de cada cultivo según fue el caso, después, se hicieron las diluciones necesarias con agua

destilada hasta obtener lecturas de 0.1 a 0.4 de absorbancia. La fase de crecimiento exponencial se consideró en base al patrón de crecimiento de *Y. lipolytica* incubada en condiciones normales (de 4 a 24 h). Para el cálculo de los tiempos de duplicación se empleó la siguiente fórmula (Young lab University of Washington, 2004) :

$$g = [\log_{10} (OD_f / OD_i)] / 0.3$$

$$td = t / g$$

Donde:

g= generaciones

td= tiempo de duplicación

log<sub>10</sub>= logaritmo base 10

t = tiempo de cultivo

OD<sub>f</sub>= OD<sub>600</sub> final

OD<sub>i</sub>= OD<sub>600</sub> inicial

#### **6.3.12.5. Procesamiento de datos**

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS V.17.0 (SPSS, Inc. Chicago Illinois, EE. UU.). Para su normalización, los valores de densidad óptica se convirtieron a logaritmo natural. Para determinar las diferencias entre el crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* y las diferencias entre los tratamientos con cafeína se utilizó el análisis de varianza con las pruebas HDS de Tukey y prueba t de Dunnet, o la prueba Games-Howell para los datos que no presentaron homogeneidad, cuando se sometieron a la prueba de Levene. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

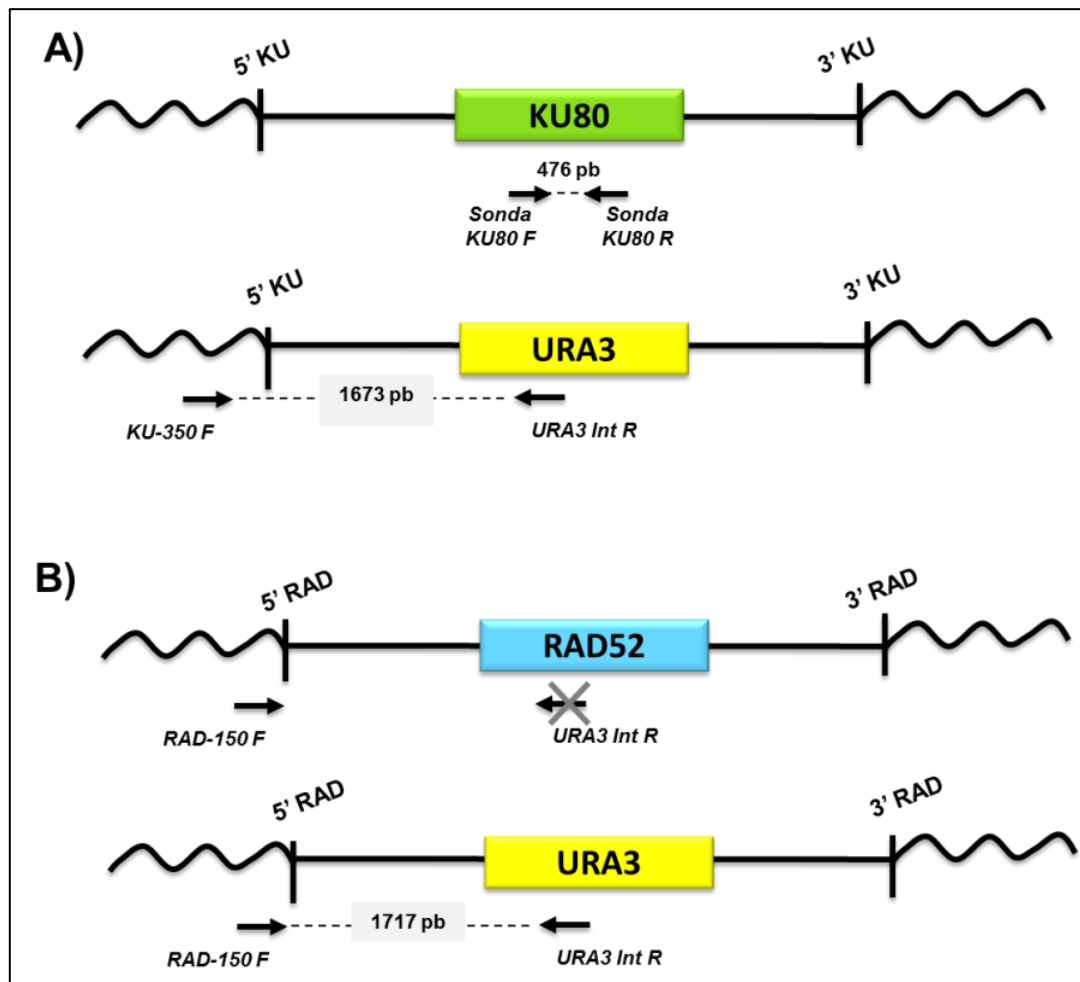
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Caracterización genotípica de las cepas de *Yarrowia lipolytica*

La caracterización genotípica de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica* se realizó por medio de ensayos de PCR usando ADN genómico de cada una de las cepas y oligonucleótidos que permiten amplificar fragmentos específicos de cada una de ellas.

Las cepas mutantes  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  fueron construidas por delección de los genes KU80 y RAD52 respectivamente, usando como gen marcador al gen URA3 (fig. 6).; por ello, para comprobar que las cepas estaban puras y poder eliminar toda posibilidad de contaminación entre ellas, para el análisis genotípico se usaron primers diseñados sobre las secuencias de los genes KU80, RAD52 y URA3, o en las regiones adyacentes a ellos. En los ensayos de PCR se probaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos utilizando una temperatura de alineamiento de 60°C, como se describe en material y métodos. En la figura 7 se muestran los resultados de la genotipificación; la figura 7A presenta los resultados de PCR sobre el ADN genómico de las cepas P01A y  $\Delta ku80$  con dos combinaciones de oligonucleótidos: en la primera combinación se usaron los primers KU-350 F+URA3 Int R, los cuales corresponden a la región de -350 pb localizado fuera del extremo 5' del gen KU80 y a la zona interna del gen marcador (URA3). En la segunda combinación se usaron los primers Sonda KU80 F y Sonda KU80 R, diseñados en la parte central del gen KU80 correspondiente a una pequeña región específica de 476 pb del gen. Con la primera combinación de oligonucleótidos (carriles 1 y 2) se obtuvo una banda específica de 1673 pb para la cepa  $\Delta ku80$  ya que uno de los oligonucleótidos utilizados en la reacción corresponde al gen marcador (URA3) presente en el sitio de delección del gen en la cepa mutante. En la cepa parental, no hay producto de amplificación ya que no está presente la secuencia del gen marcador. Por el contrario cuando se usaron los oligonucleótidos sonda KU80 F y R, se

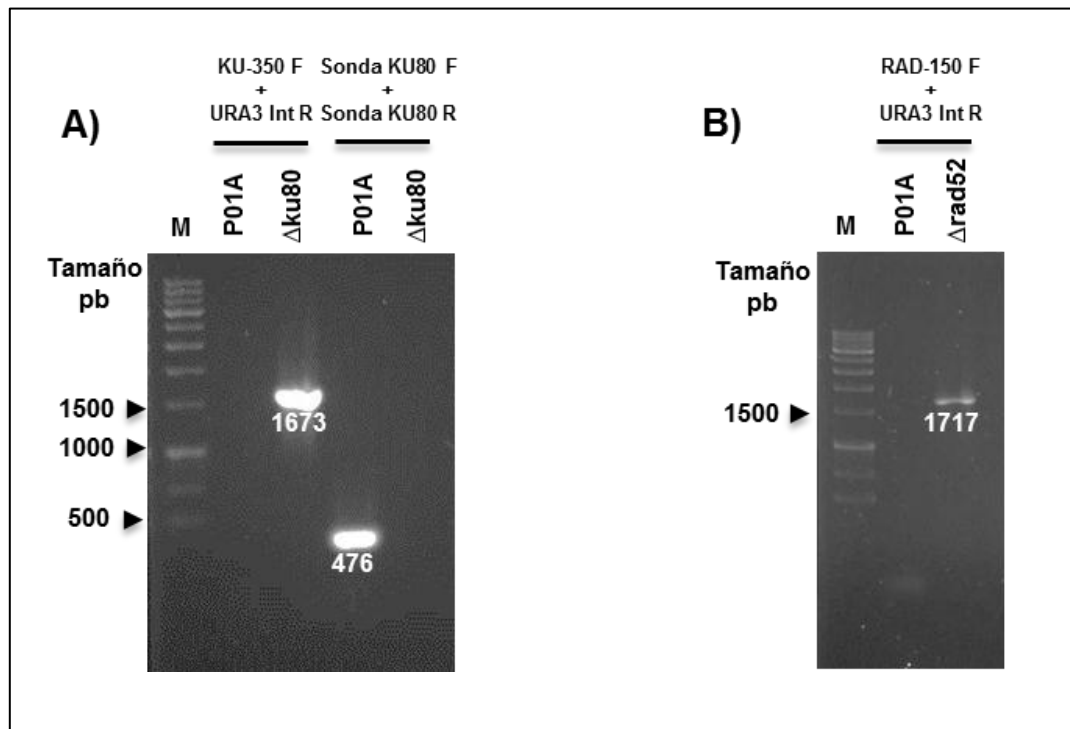
observa como producto de la amplificación una banda de aproximadamente 476 pb únicamente en el genoma de la cepa parental (carril 3), en la cepa mutante (carril 4) no hay amplificación ya que esta región había sido eliminada y sustituida por el gen URA3, para crear la mutante.



**Figura 6. Análisis genotípico de las cepas  $\Delta ku80$ ,  $\Delta rad52$  y P01A de *Y. lipolytica*.** Representación esquemática del locus de los genes KU80 (A) y RAD52 (B) en la cepa parental (P01A) y en las cepas mutantes donde los genes KU80 Y RAD52 han sido sustituidos por el gen marcador URA3. La ubicación de los oligonucleótidos empleados para el análisis genotípico se indica con flechas.

Los resultados de la genotipificación de la cepa mutante  $\Delta rad52$  se muestran en la figura 7B, en ella se observa un fragmento de 1717 pb como resultado de la amplificación con los primers RAD-150 F y URA3 Int R. Estos

oligonucleótidos corresponden, respectivamente, a la región -150 pb fuera del extremo 5' del gen RAD52 y a una zona interna del gen marcador (URA3) por lo que cuando se usó ADN genómico de la cepa P01A, no hubo amplificación, ya que en el genoma de la cepa parental no está presente la secuencia del gen marcador URA3, blanco de hibridación del oligonucleótido URA3 Int R.



**Figura 7. Caracterización genotípica de las cepas  $\Delta ku80$ ,  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica*.** Electroforesis en geles de agarosa al 2.0% donde se muestran los productos de la amplificación por PCR, específicos para cada cepa. A) Análisis genotípico de la cepa  $\Delta ku80$ ; con los oligonucleótidos KU-350 F y URA3 Int R se obtuvo un fragmento de 1673 pb cuando se usó el ADN de la cepa  $\Delta ku80$ , con el ADN de la cepa P01A no hubo amplificación; con los oligonucleótidos sonda KU80 F y sonda KU80 R se obtuvo un fragmento de 476 pb sobre el ADN de la cepa parental P01A y no hubo producto amplificado cuando se usó el ADN de la cepa mutante. B) Análisis genotípico de la cepa  $\Delta rad52$ ; como resultado de la amplificación con los oligonucleótidos RAD-150 F y URA3 Int R sobre el ADN de la cepa mutante  $\Delta rad52$  se obtuvo un fragmento de 1717 pb mientras que con el ADN de la cepa parental P01A no hubo producto amplificado. En el lado izquierdo se indica en pb el tamaño del marcador de talla molecular HyperLadder III (Bioline).



## 7.2. Evaluación cualitativa

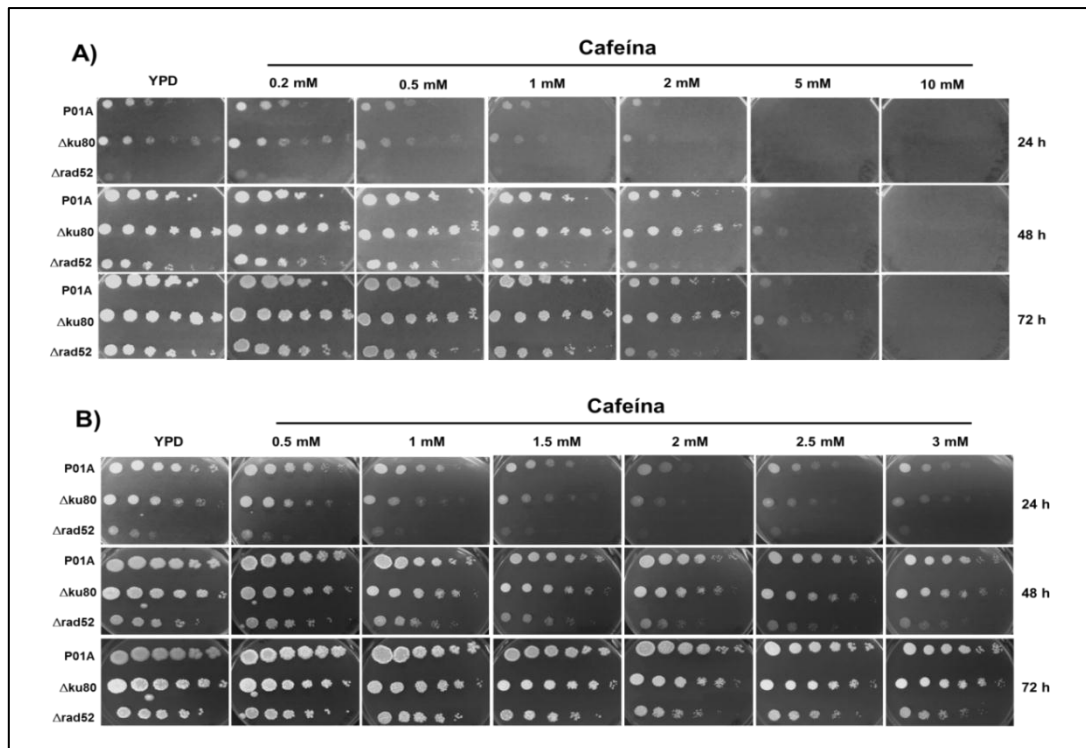
Después de corroborar la autenticidad de las cepas de estudio, el siguiente paso fue realizar una evaluación cualitativa del efecto de diferentes concentraciones de cafeína y de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) sobre el crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica*; por el método de dilución en placa se probaron diferentes concentraciones de cafeína y de  $H_2O_2$  adicionadas al medio YPD. Para realizar las comparaciones entre cepas, la cepa P01A se consideró como la cepa control y para la comparación entre las diferentes concentraciones de cafeína y  $H_2O_2$ , se consideró como control la siembra en placa con medio YPD sin la adición de ningún agente.

### 7.2.1. Selección de las concentraciones de cafeína

Como primer ensayo, la siembra de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  se realizó en placas adicionadas con concentraciones 1, 5 y 10 mM de cafeína. Las placas se incubaron en posición invertida a 28°C, protegidas de la exposición a la luz con papel aluminio; cada 24 h se tomó una fotografía de cada una de las placas. Se observó que la concentración 10 mM de cafeína fue tóxica para las tres cepas (datos no mostrados); con la concentración 5 mM se observó una disminución del crecimiento de las tres cepas, en especial para la cepa  $\Delta rad52$  y con la concentración 1 mM de cafeína el efecto de disminución de crecimiento no es perceptible en ninguna de las 3 cepas, comparándolas con el crecimiento en la placa control (YPD sin cafeína).

Posteriormente, se realizó un ensayo más fino para seguir ajustando las concentraciones incluyendo 0.2, 0.5 y 2.0 mM de cafeína, además de las tres concentraciones 1.0, 5.0 y 10 mM, ya probadas en el primer experimento (fig. 8A). Como resultado se pudo observar que a las 48 h de incubación, con las concentraciones 0.2, 0.5 y 1.0 no hay un efecto perceptible sobre el crecimiento de las cepas; mientras que con 2 mM de cafeína se vio afectado el crecimiento de las 3 cepas, principalmente el crecimiento de la cepa

$\Delta$ rad52. Sin embargo, a las 72 h de incubación se observa la recuperación del crecimiento de las cepas P01A y  $\Delta$ ku80, en menor grado para la cepa mutante rad52. Con las concentraciones 5 y 10 mM de cafeína se observó el mismo efecto descrito en el primer ensayo. Tratando de ajustar aún más el rango de las concentraciones de cafeína, se llevó a cabo un tercer ensayo en el que se probaron las concentraciones 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM (fig. 8B). En este último ensayo se observó que a las concentraciones 2.0, 2.5 y 3.0 mM de cafeína el crecimiento de las cepas comienza a disminuir, especialmente el de la cepa  $\Delta$ rad52, pues aunque en todas las concentraciones probadas se ve una recuperación del crecimiento de las cepas a partir de las 48 h de incubación, sobre la cepa  $\Delta$ rad52 esta recuperación sucede de manera más lenta.



**Figura 8. Efecto de la cafeína sobre el crecimiento de *Y. lipolytica*.** Se analizó el crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta$ ku80 y  $\Delta$ rad52 sembradas en placas de medio YPD agar adicionadas con distintas concentraciones de cafeína incubadas a 28°C protegidas de la exposición a la luz. La captura de imagen de las placas se realizó cada 24 h. A) Segundo ensayo a concentraciones 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 mM de cafeína. B) Ensayo con concentraciones entre 0.5 y 3.0 mM de cafeína con incrementos de 0.5 mM.

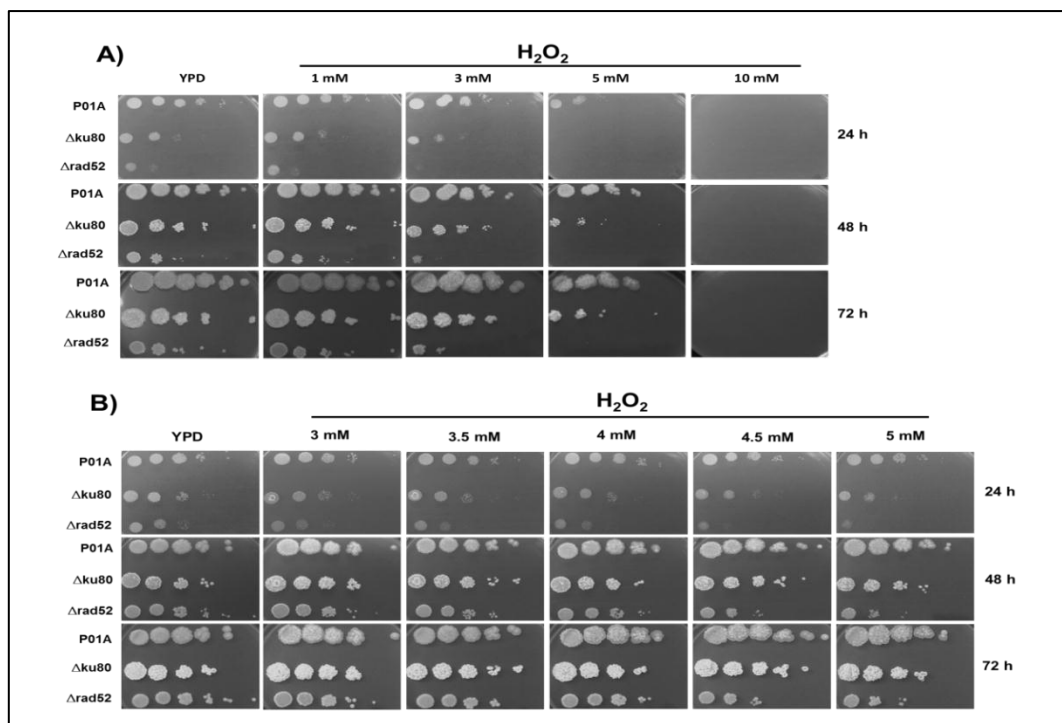
Como resultado de estos experimentos se observó que el efecto más marcado en la inhibición del crecimiento en las tres cepas se obtuvo con las concentraciones 3.0 y 5.0 mM de cafeína, siendo mayor el efecto con la concentración de 5.0 mM, por lo que se tomó la decisión de utilizar esta concentración para los ensayos cuantitativos posteriores.

### **7.2.2. Selección de las concentraciones de peróxido de hidrógeno**

El ajuste de las concentraciones de peróxido de hidrógeno también se realizó a través del análisis cualitativo por el método dilución en placa. En un ensayo preliminar se incluyeron las concentraciones 1.0, 3.0, 5.0 y 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (fig. 9A). Se observó que la concentración 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue letal para las tres cepas ya que no se observó crecimiento de ninguna de ellas aún después de incubar las placas con los cultivos por más de 72 h; también se observó que las concentraciones 3.0 y 5.0 mM provocaron un retraso en el crecimiento de todas las cepas, por lo que para el segundo ensayo se incluyeron concentraciones dentro de ese rango.

En el segundo ensayo, usando incrementos de 0.5 mM entre las concentraciones 3.0 y 5.0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observa que el crecimiento de las tres cepas a concentraciones 3.0, 3.5 y 4.0 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se comportó de manera similar a la placa control con YPD sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (fig. 9B), mientras que a las concentraciones 4.5 y 5.0 mM se observa, a las 48 y 72 h, una disminución del crecimiento de la cepa  $\Delta$ rad52. Para los análisis en la fase cuantitativa se decidió usar la concentración 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La evaluación cualitativa muestra que hay un efecto inhibitorio del crecimiento de *Y. lipolytica* tanto de la cafeína como del agente donador de radicales OH<sup>•</sup>; este efecto inhibitorio es dependiente de la dosis y se observa que es mayor en la cepa mutante rad52.



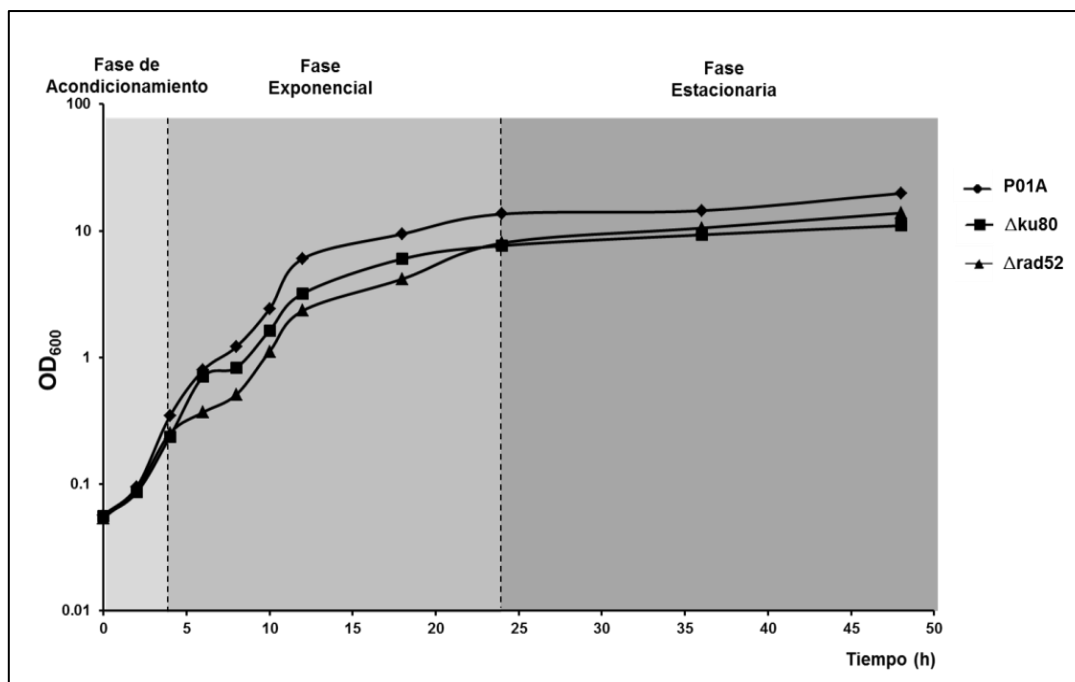
**Figura 9. Efecto de distintas concentraciones del agente oxidante ( $H_2O_2$ ) sobre el crecimiento de *Y. lipolytica*.** Monitoreo del crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  incubadas a  $28^\circ C$  en medio YPD agar adicionado con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ . La captura de imagen de las placas se realizó cada 24 h: A) ensayo preliminar con concentraciones 1.0, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 10 mM de  $H_2O_2$ . B) segundo ensayo con rangos de concentraciones más estrechos.

### 7.3. Evaluación cuantitativa

En el análisis cuantitativo se realizaron curvas de crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* para determinar sus tiempos de duplicación y comparar la velocidad del crecimiento entre ellas y entre los distintos tratamientos probados como se describe en los siguientes apartados.

#### 7.3.1. Patrón de crecimiento de *Y. lipolytica*

Para observar el comportamiento del crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica*, éstas se incubaron en medio YPD líquido a  $28^\circ C$  con agitación a 200 rpm durante 48 h; el monitoreo del crecimiento se realizó tomando la lectura de la  $OD_{600}$  cada 2 h durante las primeras 12 h, cada 6 h hasta las 24 h y finalmente cada 24 h hasta las 48 h.



**Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica*.** Las tres cepas muestran un comportamiento similar cuando son incubadas en YPD (28°C, 200 rpm) durante 48 h. Solo se observa un tiempo de duplicación menor (226 min) para la cepa parental P01A con respecto a las cepas mutantes  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  con tiempos de duplicación de 240 y 241 min, respectivamente. Los datos son expresados como logaritmo de la OD<sub>600</sub> del promedio de tres experimentos independientes. El nombre de las fases de crecimiento celular se muestra en la parte superior de la gráfica.

En la figura 10 se observa que el patrón de crecimiento de las tres cepas de *Y. lipolytica* es similar aunque como puede apreciarse, el crecimiento de las cepas mutantes fue más lento que el de la cepa parental. En la gráfica se señalan tres fases de crecimiento celular: la fase de acondicionamiento o fase lag, la cual comprende de la hora cero hasta la hora 4; la fase de crecimiento exponencial o fase log con una duración de 20 h (de las 4 a las 24 h) y la fase estacionaria de las 24 h hasta las 48 h de incubación. Después de identificar estas fases, se calcularon los tiempos de duplicación de las cepas a partir de los datos de densidad óptica determinados al inicio y al final de la fase log (4 y 24 h); estos tiempos de duplicación se compararon y se encontró que el tiempo de duplicación de la cepa P01A fue de 226 min y que las cepas mutantes tuvieron un ligero retraso en su crecimiento con respecto a ella pues el tiempo de duplicación

de la cepa  $\Delta ku80$  fue de 240 min y el de la cepa  $\Delta rad52$  fue de 241 min, sin embargo, el análisis estadístico aplicando la prueba t de Dunnett y HDS de Tukey, mostró que estas diferencias no son significativas.

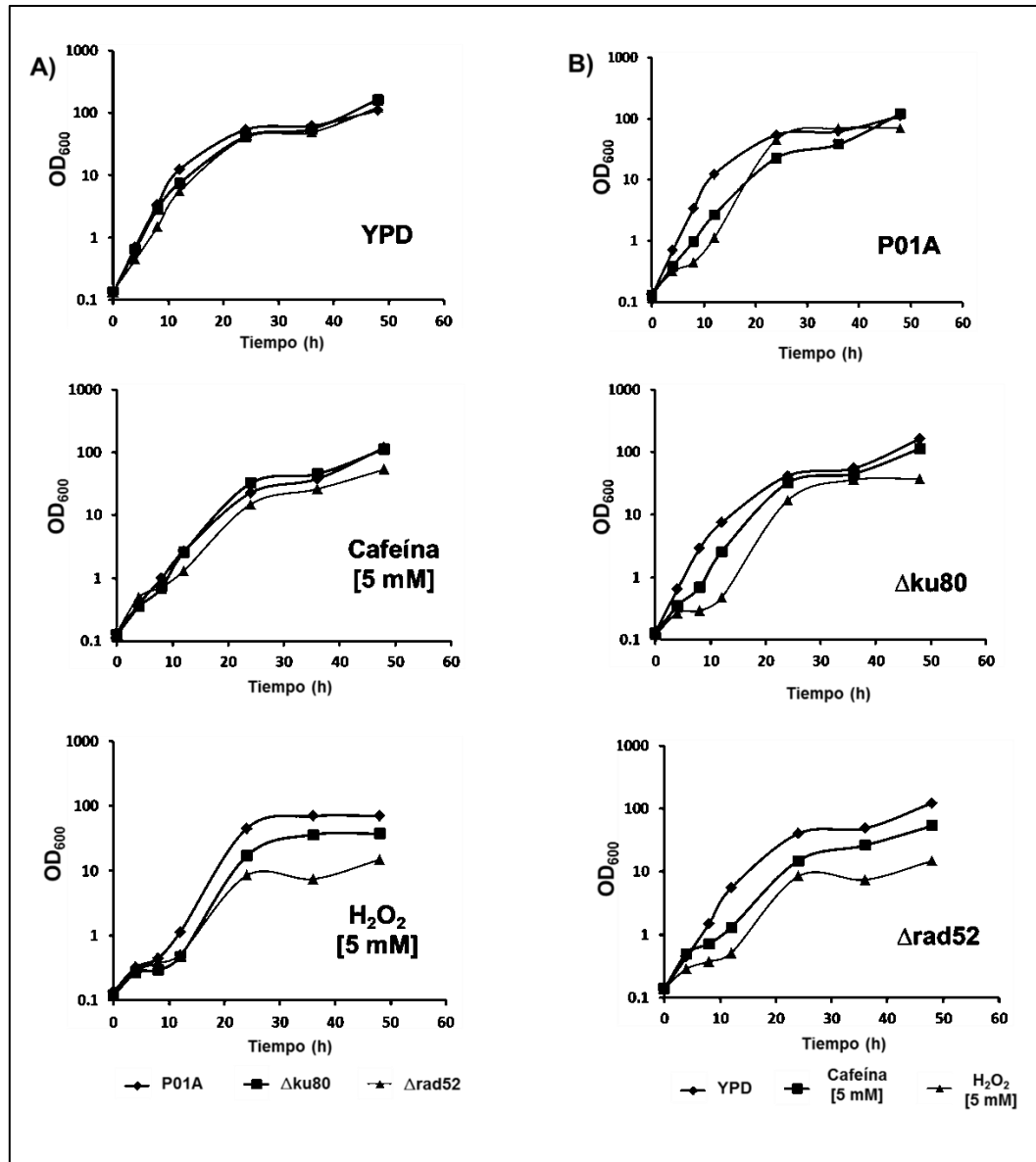
### 7.3.2. Efecto genotóxico de la cafeína

Para evaluar el posible efecto genotóxico de la cafeína se consideró el efecto de este agente sobre la disminución del crecimiento de las cepas mutantes (deficientes en los mecanismos de reparación del ADN) de *Y. lipolytica*, en relación al efecto que la cafeína puede ejercer sobre el crecimiento de la cepa parental (cuyos mecanismos de reparación del ADN están intactos). De la misma manera, se comparó el efecto de la cafeína con el provocado por el agente oxidante  $H_2O_2$ , cuya función como donador de radicales es ampliamente conocida.

La concentración utilizada tanto de cafeína como de peróxido fue 5 mM, la cual se estableció a partir de los análisis cualitativos previos. Los cultivos de las cepas en cada tratamiento se monitorearon por medio de la lectura de la  $OD_{600}$  cada 4 h durante las primeras 12 h y posteriormente a las 24, 36 y 48 h. Los resultados obtenidos se graficaron agrupando por tratamiento y por cepa (fig. 11).

El patrón de la curva de crecimiento de las 3 cepas fue similar cuando éstas se cultivaron en medio YPD y no se observaron diferencias significativas en el crecimiento. Sin embargo, en la fase lag hay una ligera disminución en el crecimiento de las cepas mutantes  $\Delta rad52$  y  $\Delta ku80$ , con respecto a la cepa parental P01A (fig. 11A). Cuando las cepas se sometieron al efecto de la cafeína, el crecimiento de las cepas  $\Delta ku80$  Y P01A fue similar y solo se observa una disminución del crecimiento de la cepa  $\Delta rad52$ . Por otra parte, cuando los cultivos se sometieron al efecto del agente productor de radicales  $OH^\bullet$  ( $H_2O_2$ ) se ralentizó el crecimiento de las 3 cepas mutantes,

observándose un efecto más notorio en la disminución del crecimiento de las cepas mutantes que tienen disminuida la capacidad de reparación del ADN.



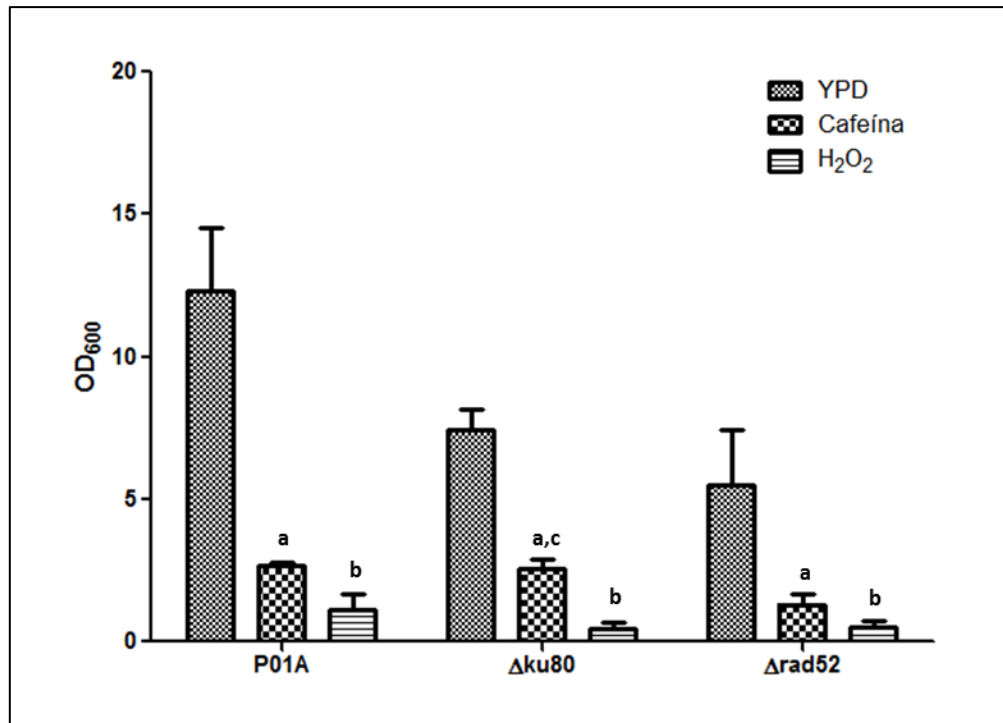
**Figura 11. Efecto de la cafeína y peróxido de hidrógeno sobre el crecimiento de *Y. lipolytica*.** Las cepas fueron incubadas en medio YPD adicionado con cafeína [5 mM] y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [5 mM] de manera independiente. El monitoreo del crecimiento de las cepas se realizó por la determinación de la OD<sub>600</sub> cada 4 h durante las primeras 12 h y posteriormente a las 24, 36 y 48 h. Los datos de densidad óptica son expresados en escala logarítmica base 10. A) Comparación del crecimiento entre las cepas incubadas en medio YPD (control), con adición de cafeína [5 mM] y peróxido de hidrógeno [5 mM]. B) Comportamiento del crecimiento de las cepas P01A, Δku80 y Δrad52 en respuesta a los tratamientos probados.

Cuando los datos se agruparon por cepa (fig. 11B) se observó que al incubar con cafeína y  $H_2O_2$  de manera independiente, el crecimiento de las tres cepas de *Y. lipolytica* disminuye desde las primeras horas de incubación, es decir, de las 4 a las 12 h. A pesar de esto, la adaptación a la presencia de cafeína o peróxido de hidrógeno se manifiesta de manera distinta para cada cepa. Las cepas P01A y  $\Delta ku80$  se recuperan del daño causado por la cafeína y  $H_2O_2$  de tal manera que a las 36 h de incubación su crecimiento es similar al de los cultivos en medio YPD (sin la adición de ningún agente), lo cual coincide con lo observado en los ensayos preliminares en placa. Sin embargo, al comparar el efecto que generan ambos agentes sobre el crecimiento de cada cepa es posible observar que la cepa P01A parece recuperarse de manera más rápida del daño por  $H_2O_2$  que del generado por cafeína (24 h). Por otra parte, aunque hay una disminución del crecimiento de las 3 cepas cuando los cultivos se realizaron en presencia de la cafeína o del  $H_2O_2$ , el efecto fue más notorio en la cepa  $\Delta rad52$  ya que aún después de 48 h de incubación no se observa la recuperación en su crecimiento.

Dado que las diferencias observadas entre el crecimiento de los cultivos con cafeína y  $H_2O_2$  se presentan desde las primeras horas (2 a 12 h) (fig. 11B), se compararon los datos de la  $OD_{600}$  obtenidos a las 12 h de cultivo que corresponde justo a la parte media de la fase de crecimiento exponencial (fig. 12). El análisis de estos datos mostró que hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el crecimiento de la cepa P01A en medio YPD y los cultivos adicionados con los agentes de estudio; el mismo efecto se observó con las mutantes  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$ . Para la cepa  $\Delta ku80$  se encontró que hay diferencia significativa entre el efecto causado por cafeína y el causado por  $H_2O_2$ , siendo el peróxido de hidrógeno el que causó mayor disminución del crecimiento. Para la cepa  $\Delta rad52$  se encontró diferencia entre el crecimiento del cultivo control (YPD) y el adicionado con  $H_2O_2$  y no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos con peróxido y cafeína. Estos resultados sugieren que en este modelo experimental la cafeína generó un efecto dañino similar al del  $H_2O_2$  (agente genotóxico conocido) y que este efecto fue



mayor sobre la cepa carente del gen RAD52, implicado en el proceso de reparación del ADN por recombinación homóloga.



**Figura 12. Crecimiento de *Y. lipolytica* a 12 h de incubación con cafeína y peróxido de hidrógeno.** La comparación del crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  después de 12 h de incubación (mitad de la fase log) en presencia de 5 mM de cafeína y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muestra el efecto inhibitorio de estos agentes sobre las 3 cepas, con mayor énfasis en la cepa mutante rad52. Se comparó el crecimiento de las tres cepas en los diferentes medios; <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup> indican las diferencias encontradas en el análisis de varianza: <sup>a</sup> YPD vs cafeína (P01A,  $p=0.032$ ), ( $\Delta ku80$ ,  $p=0.008$ ); <sup>b</sup> YPD vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (P01A,  $p=0.029$ ), ( $\Delta ku80$ ,  $p=0.018$ ), ( $\Delta rad52$ ,  $p=0.014$ ); <sup>c</sup> cafeína vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\Delta ku80$ ,  $p=0.044$ ).

Para determinar de manera cuantitativa el efecto que la cafeína tiene sobre el crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica*, se calcularon los tiempos de duplicación de cada cepa cuando éstas se sometieron al efecto de los agentes probados en los diferentes tratamientos. Los resultados que se presentan en la tabla 4 (y en la figura 13) muestran que para la cepa P01A el tiempo de duplicación aumentó en presencia de cafeína (de 188 a 202 min) y disminuyó en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (de 188 a 170 min). Este último fenómeno se puede corroborar al observar el comportamiento de la curva de crecimiento de la cepa P01A (fig. 11B); se puede ver que por efecto del

peróxido, el crecimiento de la cepa P01A presenta un retraso en las primeras horas (0-12 h) del cultivo y después de este tiempo, hay una rápida recuperación del crecimiento hasta que a las 24 h, los valores de OD<sub>600</sub> obtenidos son similares a los correspondientes al cultivo de P01A en medio YPD sin agentes adicionados, mientras que, del efecto causado por la cafeína, las células de la cepa P01A muestran una recuperación hasta después de las 48 h; sin embargo, a pesar de estas observaciones, las diferencias entre los tiempos de duplicación de la cepa P01A no fueron significativas según el análisis estadístico.

En la tabla 4 se puede ver también que la cepa  $\Delta$ ku80 cultivada en presencia de cafeína presentó tiempos de duplicación más cortos (185 min) que los cultivos en medio YPD sin adiciones (200 min), mientras que cuando se cultivó en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> los tiempos de duplicación fueron superiores (206 min) al cultivo control, sin que estas diferencias fuesen estadísticamente significativas. Este resultado, aunado a lo mostrado en la figura 11B, indica que tanto la cafeína como el peróxido causan un retraso en el crecimiento de la cepa mutante ku80 solo que la recuperación del daño causado por la cafeína es más rápida (24 h) que la recuperación del daño causado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (36-40 h).

**Tabla 4. Tiempos de duplicación de *Y. lipolytica* en presencia de cafeína y peróxido de hidrógeno**

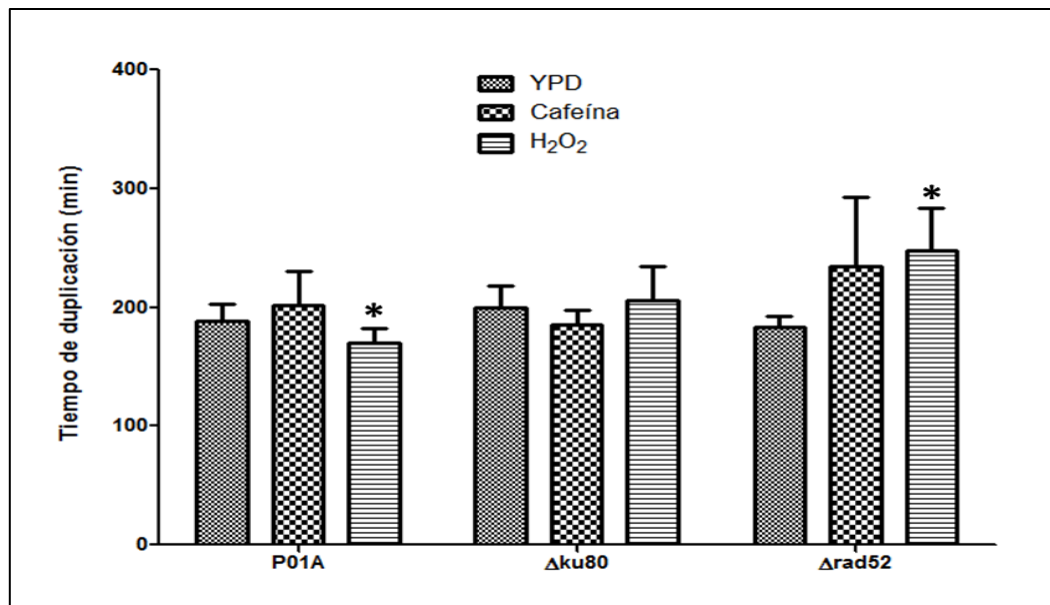
Cepa	Tiempo de duplicación (min)		
	YPD	Cafeína	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
P01A	188 ± 15	202 ± 28	170 ± 12
$\Delta$ ku80	200 ± 18	185 ± 13	206 ± 28
$\Delta$ rad52	183 ± 10	234 ± 59	248 ± 36*

Los datos se expresan como media  $\pm$  de la desviación estándar de los tiempos de duplicación en minutos calculados a partir de los datos de la OD<sub>600</sub> obtenidos a las 4 y 24 h de incubación de tres experimentos independientes. Análisis de varianza con la prueba HSD de Tukey: \* indica diferencia significativa ( $p= 0.032$ ) entre las cepas P01A y  $\Delta$ rad52 en presencia de peróxido de hidrógeno.

Para la cepa  $\Delta rad52$  hubo un incremento en los tiempos de duplicación en presencia de ambos agentes. Cuando se incubó en presencia de cafeína el tiempo de duplicación fue de 234 min y cuando se incubó en presencia de  $H_2O_2$  el tiempo de duplicación fue ligeramente mayor (248 min) mientras que el tiempo de duplicación del grupo control (cultivos en YPD sin adiciones) fue de 183 min estas diferencias no son estadísticamente significativas.

De la misma manera que la cepa parental y la cepa  $\Delta ku80$ , en la mutante  $rad52$  tanto la cafeína como el peróxido causan un retraso en del crecimiento, sin embargo, se observa que a diferencia de las anteriores, esta última cepa no es capaz de recuperarse del daño ocasionado por la cafeína, ni del daño ocasionado por el agente donador de radicales libres.

El análisis comparativo de los tiempos de duplicación entre las diferentes cepas de *Y. lipolytica*, muestra que la disminución de la velocidad de crecimiento de la cepa  $\Delta rad52$  fue significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a la cepa parental P01A en presencia de  $H_2O_2$  (tabla 4).



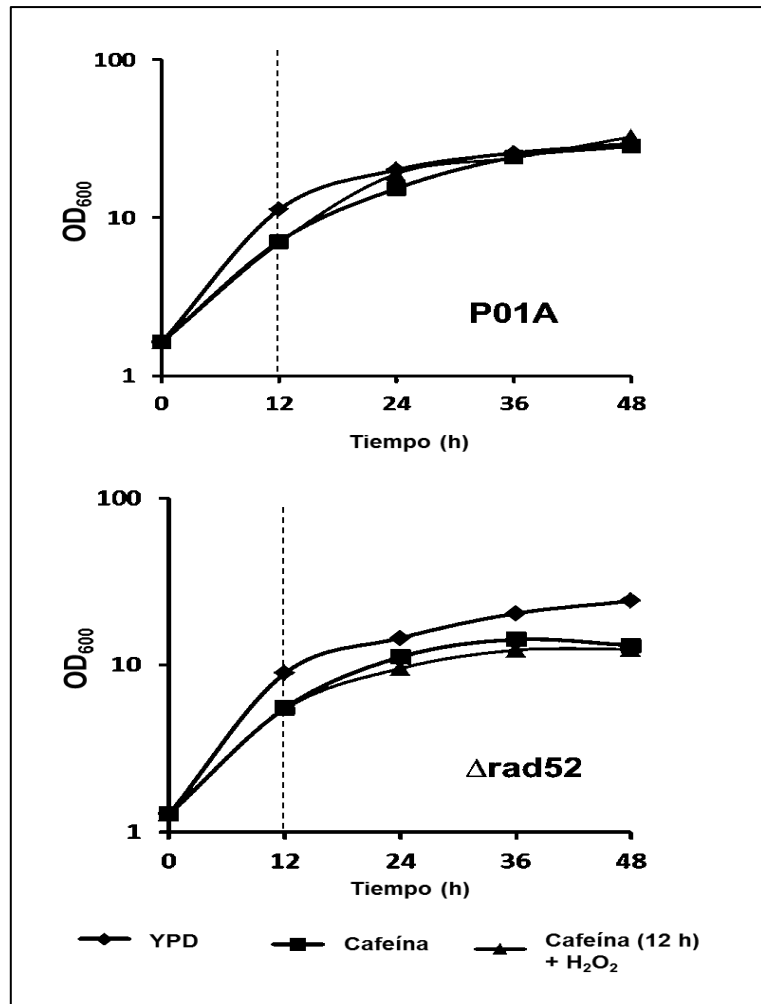
**Figura 13. Efecto de la cafeína y peróxido de hidrógeno sobre el tiempo de duplicación de *Y. lipolytica*.** Se probaron las concentraciones 5 mM de cafeína y peróxido de manera independiente. Los tiempos de duplicación se determinaron a partir de los datos de la OD<sub>600</sub> obtenidos a las 4 y 24 h de incubación. El análisis de varianza con las pruebas HDS de Tukey mostró una diferencia significativa ( $p= 0.032$ ) entre los tiempos de duplicación de las cepas P01A y  $\Delta rad52$ , cultivadas en presencia de  $H_2O_2$ .

### 7.3.3. La cafeína como posible agente antioxidante

Para evaluar el posible efecto protector de la cafeína, se probó si la respuesta celular a cafeína favorecía la respuesta de defensa contra el daño generado por el  $H_2O_2$ . Se probó un modelo de acondicionamiento celular que consistió en incubar por 12 h (tiempo considerado la mitad de la fase de crecimiento exponencial) a las cepas P01A y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica* en medio YPD adicionado con cafeína y someterlas posteriormente al efecto del  $H_2O_2$  adicionado al medio de cultivo. La decisión de incluir únicamente a las cepas P01A y  $\Delta rad52$  en esta fase del trabajo se tomó en base a las diferencias entre estas cepas encontradas en las evaluaciones previas.

En la figura 14 se puede observar que tanto la cepa P01A como la cepa  $\Delta rad52$  tuvieron un crecimiento menor cuando se incubaron con cafeína, comparados con el crecimiento de los cultivos en medio YPD sin adiciones. También se observa que el comportamiento del patrón de crecimiento de los cultivos en presencia de cafeína con el crecimiento observado en los cultivos pre tratados (12 h) con cafeína y posterior adición de  $H_2O_2$  fue similar en ambas cepas. En la gráfica correspondiente a la cepa  $\Delta rad52$  (fig. 14) es posible observar una ligera disminución del crecimiento cuando se adiciona el  $H_2O_2$ , sin embargo esta disminución del crecimiento no es significativa y el patrón de crecimiento es similar al de la cepa incubada únicamente con cafeína a lo largo de toda la curva.

Es interesante notar que aunque el comportamiento de los cultivos con cafeína con y sin adición de  $H_2O_2$  es similar en ambas cepas, el crecimiento de la cepa P01A en ambas condiciones se recupera entre las 24 y las 36 h de incubación alcanzando valores similares al cultivo control, mientras que en la cepa mutante, aún después de incubar los cultivos por periodos largos (hasta 72 h, datos no mostrados) no se observa una completa recuperación del daño ocasionado por los agentes, a juzgar por la disminución del crecimiento de esta cepa.



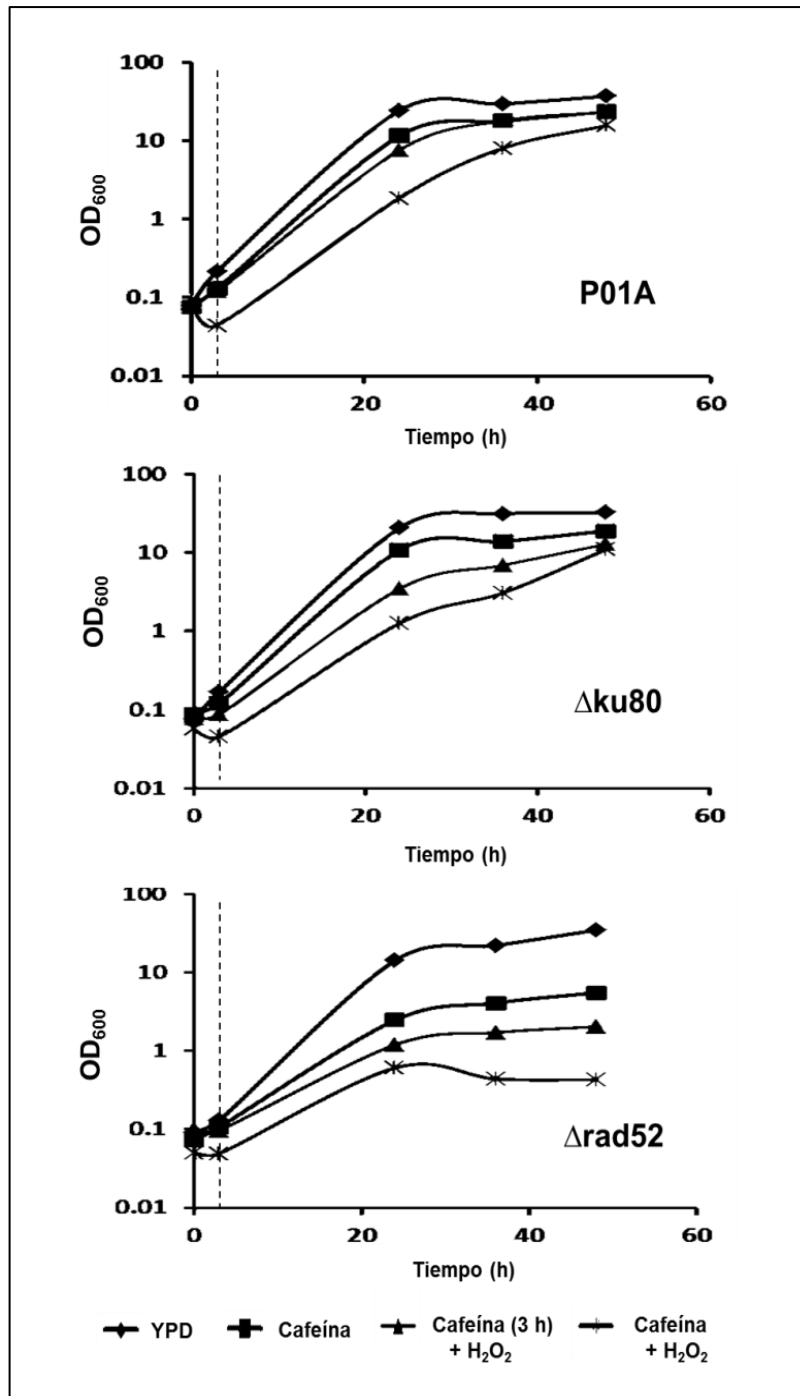
**Figura 14. Respuesta de *Y. lipolytica* al daño oxidativo después del pre-tratamiento con cafeína durante 12 h.** Las cepas P01A y  $\Delta rad52$  se incubaron a 28°C durante 12 h, con agitación (200 rpm), en medio YPD adicionado con 5 mM de cafeína; posteriormente se adicionó al medio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM] (tiempo señalado con línea punteada) y se continuó con la incubación. El monitoreo el crecimiento de las cepas se realizó por determinación de la OD<sub>600</sub>. Los datos graficados corresponden al promedio de dos ensayos independientes y son expresados como logaritmo escala 10.

Considerando que el pre-tratamiento con cafeína durante 12 h supone que las células han alcanzado etapas de crecimiento y diferenciación avanzadas (parte media de la fase log), y que por lo tanto la gran mayoría de estas células ya no serían susceptibles al efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se decidió realizar una serie de experimentos adicionando a los cultivos el agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) después de una incubación con cafeína menos prolongada (3 h), con la finalidad de probar si la adición de cafeína dentro del tiempo de la fase de

acondicionamiento celular es capaz de mejorar la resistencia al efecto del  $H_2O_2$ . En estos experimentos se incluyó la mezcla de cafeína y  $H_2O_2$  desde el inicio del experimento como un control para determinar comparativamente si la mezcla simultánea de cafeína y  $H_2O_2$  en el medio favorecía el crecimiento de las cepas, suponiendo una disminución de los radicales libres  $OH^\bullet$  por efecto de la cafeína.

En estos experimentos, las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica* fueron incubadas durante 3 h en medio YPD adicionado con una concentración 5 mM de cafeína; después de este tiempo de incubación, a los matraces con los cultivos se agregó la cantidad necesaria de  $H_2O_2$  hasta alcanzar una concentración de 5 mM. Para los otros cultivos, las mismas cepas se incubaron en medio YPD adicionado con 5 mM de cafeína y 5 mM de  $H_2O_2$ . Como controles se incluyeron cultivos en medio YPD y cultivos en YPD+cafeína.

En la figura 15 se observa que la adición de  $H_2O_2$  posterior a la incubación durante 3 h con cafeína causó una disminución del crecimiento de las tres cepas en comparación al cultivo control (medio YPD). Es interesante notar que bajo este tratamiento la cepa parental P01A presenta un patrón de crecimiento similar al del cultivo en medio adicionado solo con cafeína, mientras que el crecimiento de las cepas mutantes  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  es menor al del cultivo en presencia de cafeína siendo estos valores aún menores en la cepa  $\Delta rad52$ . Además, los cultivos de las cepas P01A y  $\Delta ku80$  en todos los tratamientos presentan una recuperación del crecimiento alcanzando valores similares a los controles después de 48 h de incubación, mientras que en la cepa  $\Delta rad52$ , a este tiempo de incubación, no se observa recuperación del crecimiento y las diferencias entre los tratamientos son mayores. Estos resultados sugieren que la cafeína y el peróxido tienen un efecto aditivo inhibitorio del crecimiento de *Y. lipolytica*, y que este efecto es mayor sobre la cepa mutante *rad52*, deficiente en el mecanismo de reparación del ADN por recombinación homóloga.



**Figura 15. Cafeína como posible agente antagonístico del daño oxidativo en *Y. lipolytica*.** Análisis comparativo del efecto de la pre-incubación con cafeína (3 h) antes de la adición  $H_2O_2$  sobre el crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$ . Se incluyen también datos del patrón de crecimiento de las cepas cultivadas en medio YPD+ $H_2O_2$  a una concentración 5 Mm de cada uno de ellos. El monitoreo del crecimiento se realizó a través de la lectura de la  $OD_{600}$  a las 3, 24, 36 y 48 h de incubación. Los datos corresponden a un solo ensayo y son expresados en escala logarítmica base 10. La línea punteada indica le tiempo en el cual fue adicionado el agente oxidante.

Adicionalmente, para comparar el grado de afectación de cada cepa en respuesta a estos tratamientos, se calculó el valor de la OD de los cultivos a las 12 h de incubación en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (parte media de la fase de crecimiento exponencial) en la muestra pre tratada (3 h) con cafeína y se compararon con el resto de los tratamientos (fig.15). Con los datos obtenidos se estimó el porcentaje de disminución del crecimiento de las cepas considerando como controles (100%) los cultivos incubados únicamente en medio YPD. Los porcentajes de disminución de crecimiento de las cepas se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Disminución porcentual del crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* sometidas a diferentes tratamientos con cafeína o peróxido de hidrógeno.**

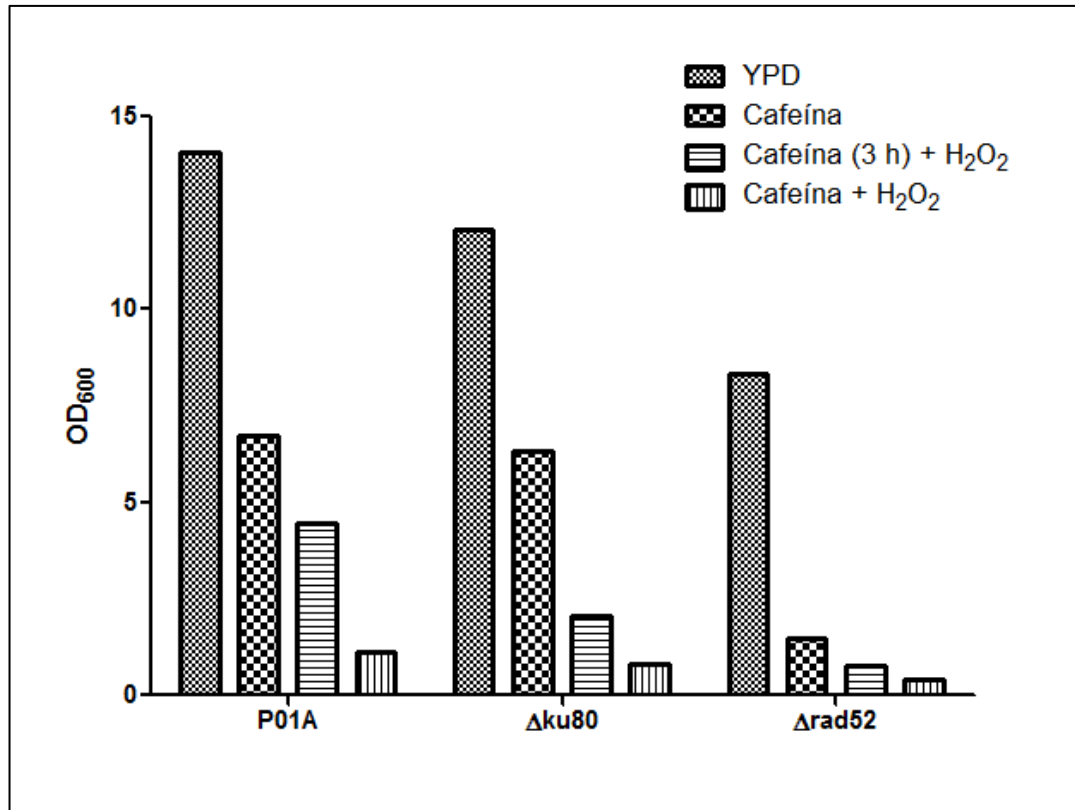
Cepa	Tratamientos				
	YPD	Cafeína	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Cafeína (3 h) + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Cafeína + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
P01A	----	53%	31%	68%	92%
Δku80	----	48%	66%	83%	93%
Δrad52	----	82%	78%	91%	95%

El porcentaje de disminución de crecimiento se determinó con los valores de la OD<sub>600</sub> calculados a las 15 h de incubación de las cepas (12 h posteriores de la adición del agente oxidante). ---- valor control; considerado como el 100% del crecimiento en YPD para cada cepa.

Cuando se compararon los porcentajes de disminución del crecimiento de las cepas, se observó que la cafeína afecta el crecimiento de las tres cepas de *Y. lipolytica* disminuyendo en un 53% el crecimiento de la cepa P01A, en un 48% el de la cepa Δku80 y en un 82% el de la cepa Δrad52. Cuando las cepas fueron pre incubadas con cafeína por 3 h, la disminución del crecimiento tuvo un comportamiento similar al descrito para la cafeína, siendo la cepa Δrad52 la más afectada con una disminución del 91% de su



crecimiento (ver tabla 5). La mezcla cafeína-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue el tratamiento que presentó un efecto más homogéneo inhibitorio del crecimiento, generando una disminución del 92, 93 Y 95% para las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$ , respectivamente. Sin embargo, como ya se describió antes, las cepas P01A y  $\Delta ku80$  muestran una mayor recuperación del crecimiento a tiempos de incubación más prolongados (fig. 15).



**Figura 16. Disminución del crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* en presencia de cafeína como agente antioxidante.** Se muestra la comparación del crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  ante la presencia de cafeína, la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> posterior a una incubación con cafeína por 3 h y la mezcla cafeína-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La concentración utilizada de los agentes de estudio fue 5 mM. Los datos de la OD<sub>600</sub> comparados corresponden los calculados para la hora 15 de incubación de un solo ensayo.

## 8. DISCUSIÓN

La cafeína es un compuesto ampliamente consumido en el mundo a través de alimentos como el chocolate, el café, el té, bebidas gaseosas y algunas medicinas (Ogawa & Ueki, 2007). Se ha evidenciado que en el humano la cafeína participa en la inhibición del sueño mejorando la capacidad de atención y alerta. En términos generales la cafeína es asociada con algunos beneficios a la salud como la disminución de los síntomas de la enfermedad de Parkinson, la reducción de peso y el riesgo a padecer diabetes mellitus. Por otra parte, también existen evidencias del efecto tóxico/nocivo de la cafeína, aunque se ha estipulado que la cantidad de cafeína necesaria para generar un efecto nocivo al organismo puede variar entre individuos (Higdon & Frei, 2006) y que las sobredosis agudas llegan a causar taquicardia, diuresis, hipertensión y otras alteraciones en el metabolismo (Reissig, Strain, & Griffiths, 2009). Sin embargo, a nivel celular existe polémica en cuanto a los efectos generados por cafeína, en algunos estudios han propuesto que la cafeína puede ejercer un efecto antioxidante protegiendo del daño ocasionado por especies reactivas de oxígeno mientras que otros estudios afirman que la cafeína ocasiona un efecto genotóxico.

Las levaduras se han convertido en un excelente modelo de estudio celular debido a las similitudes que se han encontrado entre su ADN y el del ser humano, además, su manipulación es fácil y segura. En las últimas dos décadas *Y. lipolytica* ha sido establecida como modelo de estudio para el análisis de múltiples procesos celulares como el estrés oxidativo, así como para la producción de ácidos orgánicos y proteínas heterólogas (Farrugia, & Balzan, 2012; Kretzschmar, Otto, Holz, Werner, Hübner, & Barth, 2013).

La asociación de algunos compuestos encontrados en los alimentos con el daño oxidativo del ADN y sus sistemas de reparación ha sido ampliamente investigada. Se ha descrito que algunos compuestos provenientes de la dieta inducen la generación de lesiones en el ADN que son reparadas de diversas maneras (Takeshi, & Kazuyoshi, 2011). Estas

lesiones pueden contribuir a la aparición de enfermedades como el cáncer y la diabetes.

Este trabajo se realizó para evaluar los efectos genotóxico o antioxidante que de manera controversial le han sido atribuidos a la cafeína. Como modelo de estudio se usaron tres cepas del hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*, la cepa parental P01A y dos cepas mutantes deficientes en genes implicados en los mecanismos de reparación del ADN, KU80 y RAD52.

La utilización de *Y. lipolytica* como modelo experimental se eligió debido al costo beneficio que tiene, pues además de que su manipulación es sencilla, lograr niveles experimentales de cafeína en humanos podría ser muy difícil sin causar efectos adversos. Se consideró incluir a las cepas mutantes  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  ya que al no poder corregir adecuadamente los posibles daños ocasionados a la doble cadena de ADN, el crecimiento de estas cepas resultaría más afectado que el crecimiento de la cepa parental.

En la primera parte del trabajo se realizó el análisis genotípico de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica* para comprobar que se contaba con cepas puras para la realización de los experimentos. El análisis por PCR permitió asegurar la autenticidad de las cepas utilizando oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos de ADN específicos de cada cepa.

Como punto de referencia del daño genotóxico se incluyó un agente químico de acción dañina conocida, se decidió utilizar el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) debido a que es un agente donador de radicales  $OH^\bullet$  altamente nocivo para moléculas como el ADN, proteínas y lípidos (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991). Además el  $H_2O_2$  ha sido utilizado por excelencia en estudios de respuesta al daño oxidativo en células de mamíferos, bacterias y levaduras (Lopes, Mota, & Belo, 2013; Marinho, Real, Cyrne, Soares, & Antunes, 2014).

Para determinar el efecto de la cafeína sobre *Y. lipolytica*, en la primera fase se determinaron de manera cualitativa (por el método de dilución en placa) las concentraciones de cafeína y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que pudiesen mostrar un efecto inhibitorio del crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta$ ku80 y  $\Delta$ rad52. Se encontró que la concentración 10 mM de cafeína inhibió el crecimiento de las 3 cepas aún después de tiempos de incubación prolongados. Efectos similares fueron obtenidos por Calvo y colaboradores (2009) quienes utilizando el mismo método, encontraron que la concentración 10 mM de cafeína disminuyó el crecimiento de la levadura *S. pombe* y que la concentración 15 mM de cafeína resultó tóxica después de 72 h de incubación. En otro tipo de ensayos utilizando células linfoblásticas humanas se mostró que la cafeína (10 mM) es capaz de inhibir enzimas (ATM/ATR) que participan en la detección de daños al ADN causados por factores oxidantes (Block *et al.*, 2004).

Cuando se probaron concentraciones menores (0.2 a 3.0 mM) de cafeína, se observó que éstas no generaron un daño perceptible sobre el crecimiento de ninguna de las cepas, mientras que a concentración 5 mM de cafeína sí se observó inhibición del crecimiento de todas las cepas. En un trabajo de Deplanque y colaboradores (2004), se reportó que en células de carcinoma de tiroides modificadas en las cascadas de señalización apoptóticas que fueron tratadas de 1 a 4 h con 2 mM de cafeína y sometidas a una posterior exposición al agente quimioterapéutico ciplastino y a radiaciones UV, la cafeína potenció la inhibición de la proliferación celular, especialmente cuando las células fueron sometidas al efecto de radiaciones UV.

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se ha considerado como agente oxidante donador de radicales OH<sup>•</sup> causante de estrés oxidativo y daño al ADN. Debido a que se ha reportado que las levaduras tienen diferente sensibilidad al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lopes *et al.*, 2013) era importante probar el efecto de distintas concentraciones que ocasionaran un daño perceptible sobre sobre

el crecimiento de *Y. lipolytica*. Utilizando el mismo método cualitativo se determinó que la concentración 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue letal para todas las cepas ya que no se observó recuperación en su crecimiento aún después de incubación por periodos mayores a 72 h. Cuando las placas se adicionaron con concentraciones de 1.0 a 4.5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se presentó un efecto perceptible de la inhibición del crecimiento en ninguna de las cepas. En estudios realizados utilizando la levadura *S. pombe*, Calvo y colaboradores (2009) encontraron que las concentraciones 1 y 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tuvieron efecto sobre la disminución del crecimiento de *S. pombe*. En el presente estudio, se determinó que la concentración 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causó inhibición del crecimiento de las tres cepas.

Desde los resultados de esta fase cualitativa se observó que el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de estos agentes se presentó sobre la cepa  $\Delta$ rad52. Es posible que las células de la mutante  $\Delta$ rad52 haya presentado un menor crecimiento ante la exposición a cafeína y a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a que esta cepa carece del gen RAD52 el cual cumple una función primordial en el proceso de reparación del ADN por en el mecanismo de recombinación de secuencias homólogas (HR); esta observación se discutirá más adelante.

Una vez determinadas las concentraciones de cada uno de los agentes (5 Mm de cafeína y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) capaces de ocasionar un posible daño a las células (juzgado por la inhibición de su capacidad de crecimiento), el siguiente paso fue evaluar de manera cuantitativa el efecto de estos agentes. El primer ensayo consistió en realizar curvas de crecimiento de las cepas P01A,  $\Delta$ ku80 y  $\Delta$ rad52 para identificar las diferentes fases de la curva de crecimiento de *Y. lipolytica* en condiciones normales, es decir, sin la adición de ningún agente químico al medio de cultivo YPD. El crecimiento de las cepas mutantes presentó un leve retraso en comparación con la cepa parental P01A, este resultado es acorde a lo reportado por otros autores que han descrito que en *Y. lipolytica* la delección de los genes KU80 y RAD52 *per se* retrasa su crecimiento (Verbeke *et al.*, 2013; Campos-Góngora *et al.*,

2013). Este fenotipo de crecimiento lento ya ha sido observado también sobre otras cepas mutantes carentes del gen RAD52 en levaduras como *Candida albicans* y *S. cerevisiae* (Ciudad *et al.*, 2004; Andaluz, Ciudad, Gómez-Raja, Calderone, & Larriba, 2006).

En la primera etapa del análisis cuantitativo se evaluó el posible efecto genotóxico de la cafeína comparando los tiempos de duplicación de los cultivos de las 3 cepas de *Y. lipolytica* adicionados con cafeína con los tiempos de duplicación de los cultivos adicionados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bajo el efecto de ambos agentes, las tres cepas disminuyeron su velocidad de crecimiento con respecto a los cultivos control (en medio YPD), sin embargo se observó que al final de la fase de crecimiento exponencial, tanto la cepa parental P01A como la cepa  $\Delta$ ku80 presentaron una recuperación de crecimiento hasta alcanzar valores similares a los controles (ver fig. 7), mientras que la cepa  $\Delta$ rad52 no se recuperó del efecto de estos agentes aún después de periodos de incubación mayores a 48 h. Es posible que este fenómeno se deba a que la cepa P01A tiene íntegros sus mecanismos de reparación del ADN lo cual le permite reparar el daño ocasionado tanto por la cafeína como por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En otros estudios se ha demostrado que comparada con levaduras como *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* tiene mayor resistencia al efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jamieson, 1998) y que este compuesto es capaz de despertar una respuesta de defensa celular incrementando la síntesis de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión reductasa y catalasas); en *Y. lipolytica* esta respuesta es mayor que la observada en la levadura *Pichia pastoris* (Lopes *et al.*, 2013).

Cuando se comparó el crecimiento de las cepas, después de 12 h de incubación (parte media de la fase de crecimiento exponencial), se encontró una disminución significativa del crecimiento de las tres cepas cultivadas en presencia de cafeína y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La cepa  $\Delta$ ku80 resultó más afectada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que por cafeína, mientras que para la cepa  $\Delta$ rad52 no se encontró diferencia entre el efecto que sobre el crecimiento tienen tanto la cafeína como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Estos resultados son apoyados por el análisis comparativo de los tiempos de duplicación calculados para cada una de las cepas. En presencia de cafeína y  $H_2O_2$  la disminución de los tiempos de duplicación de las cepas P01A y  $\Delta ku80$  propició una recuperación de su crecimiento, fenómeno que no se observó para la cepa  $\Delta rad52$ . En conjunto, estos resultados sugieren que la cafeína tiene un efecto citotóxico a juzgar por el efecto inhibitorio del crecimiento que causa sobre las 3 cepas, y el mayor efecto observado sobre las mutantes ( $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$ ) el cual es similar al del  $H_2O_2$ , es un indicativo del efecto genotóxico de la cafeína.

Las diferencias del efecto genotóxico de la cafeína entre las dos cepas mutantes analizadas se puede explicar de la siguiente manera: el mantenimiento de la integridad del genoma es posible gracias a que el ciclo celular atraviesa por puntos de control encargados de detectar daños al ADN; estos puntos de control han sido descritos en células humanas y en organismos inferiores como las levaduras. La exposición a agentes causantes de daño al ADN inducen a una pausa o arresto en la progresión del ciclo celular en distintos puntos de control para permitir que se lleve a cabo la reparación del ADN, pero si el daño es extenso se conduce a apoptosis (Bode & Dong, 2007). Las rupturas de la doble cadena de ADN son un daño ocasionado principalmente por agentes químicos externos; para subsanar este tipo de daño entran en marcha principalmente dos mecanismos de reparación del ADN: la recombinación de extremos homólogos (HR) y la recombinación de extremos no homólogos (NHEJ). Estos mecanismos son activados dependiendo de la cantidad de cinasas dependientes de ciclinas (Cdk), las cuales son enzimas que regulan el ciclo celular. Concentraciones bajas de Cdk durante la fase G1 inducen la participación del complejo dimérico Ku70/Ku80 para la reparación de rupturas de la doble cadena de ADN; este complejo se une de manera inmediata a los extremos de la cadena de ADN desacoplada para evitar la pérdida de información. Por otra parte, las fases S y G2 son momentos del ciclo celular donde la actividad de las Cdk es más elevada y cualquier ruptura

de la cadena de ADN no es detenida por el complejo Ku70/Ku80, sino que se provoca la integración del filamento Rad51 y del complejo proteico Rad52, Rad55-Rad57, Rad54 que participa en la recuperación de la información, ya que en este punto del ciclo celular (fase S y G2) aún se encuentra disponible una cromátide hermana de la cual pueda hacerse una copia y recuperar la información perdida durante la ruptura de la doble hélice (Finn *et al.*, 2012).

Entre los efectos tóxicos que se han descrito de la cafeína en diferentes tipos celulares se encuentra el arresto del ciclo celular, el cual también ha sido reportado en levaduras como *S. cerevisiae* (Calvo *et al.*, 2009). Se ha propuesto que concentraciones de 1 a 2 mM de cafeína pueden generar un arresto del ciclo celular en fase G1, mientras que concentraciones de 2 a 4 mM parecen bloquear este arresto en G1 e inducir apoptosis, por otra parte, concentraciones mayores de cafeína se han asociado directamente al arresto en fase G2 (Bode & Dong, 2007).

El mecanismo por el cual la cafeína genera una detención del ciclo celular es a través de la inhibición de las proteínas que participan en los puntos de control de detección del daño al ADN (Rad3 en levaduras, ATM/ATR en mamíferos) (Moser, Brondello, Baber-Furnari, & Russell, 2000). En 2004, Wang y colaboradores, encontraron que concentración 2 mM de cafeína no generó deleciones simples en el ADN en células ováricas de hámster (CHO 33), sin embargo detectaron que la activación de la proteína Rad51 disminuyó cuando las células fueron tratadas con cafeína 4 mM al ser o no sometidas a la exposición de rayos X, por lo que propusieron que la cafeína podría tener un efecto inhibitorio de la reparación de extremos homólogos mediante la inhibición de las cinasas ATM y ATR (relacionadas al censado del daño al ADN).

Aunque daños extensos al ADN conducen a apoptosis, bajo las condiciones probadas (5 mM de cafeína) el crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* no disminuyó de manera total, sin embargo el crecimiento de las cepas mutantes deficientes en los mecanismos de reparación del ADN



crecieron de manera distinta. Esto hace notar a pesar de que las proteínas Ku80 y Rad52 participan en la reparación de rupturas de la doble cadena de ADN por mecanismos distintos, la recombinación de extremos no homólogos no fue suficiente para reparar los daños ocasionados por cafeína en la cepa mutante *rad52* probablemente a causa de que la cafeína propició la detención del ciclo celular en una fase específica (G2) donde esta vía de reparación es ineficiente debido a que las concentraciones de Cdk son altas.

Los resultados sugieren que además de la capacidad que tienen las células para detener su crecimiento en respuesta a factores de estrés, la diferencia de la sensibilidad de las cepas  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica* podría derivarse del tiempo que pasan en fase G1 o G2 durante el ciclo celular.

Numerosos estudios han atribuido a la cafeína un efecto antioxidante. Ensayos *in vitro* sobre el cristalino de ratones incubados a concentración 5 mM de cafeína mostraron su participación en la supresión de radicales  $OH^{\bullet}$  (Varma & Hegde, 2010 b). En un estudio sobre la modulación de agentes antioxidantes en cerebro de ratas Wistar sometidas a dietas con suplementación de cafeína (20 a 40 mg/kg/día) se propuso a la cafeína como moduladora del daño oxidativo ya que favoreció la integridad de los lípidos de la membrana celular e incrementó la concentración de enzimas antioxidantes (Abreu *et al.*, 2011).

Por otra parte, los estudios realizados por Mercer y col. (2012) han evaluado el aspecto aterogénico de tratamiento con cafeína (100 a 400  $\mu g$ ) en células del músculo de la aorta de ratones después de ser sometidas a daño al ADN y a especies reactivas de oxígeno (ROS), ellos encontraron un efecto regulador de la proliferación celular y apoptosis como resultado inhibitorio del daño al ADN, con lo que se propuso que la cafeína participa en la captura de ROS.

En humanos, la modulación de la respuesta inmune en el tratamiento del cáncer y la disminución del efecto tóxico causado por los reactivos quimioterapéuticos en el organismo se ha asociado a concentraciones plasmáticas de cafeína entre 1-50  $\mu\text{M}$  (225-450 mg) (Sabisz & Skladanowski, 2008).

Para probar el posible efecto antioxidante, la segunda parte del estudio consistió en determinar si la cafeína favorecía la respuesta al estrés oxidativo. Las cepas P01A y  $\Delta\text{rad52}$  de *Y. lipolytica* fueron incubadas en medio YPD adicionado con cafeína (concentración final 5 mM) por 12 h y posteriormente, sometidas a la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) en el medio. Se incluyeron solo dos cepas, debido a que el efecto de la cafeína se mostró más marcado sobre la cepa  $\Delta\text{rad52}$  en los primeros ensayos del estudio.

Como ya se esperaba, el crecimiento de ambas cepas disminuyó al incubarse con cafeína, sin embargo, no se encontró diferencia entre el crecimiento de los cultivos de ambas cepas sometidos al pre tratamiento con cafeína durante 12 h. El crecimiento de la cepa P01A mostró una recuperación entre las 24 y 36 h, lo cual no sucedió para la cepa  $\Delta\text{rad52}$ . Es posible que estos resultados se deban a que bajo las condiciones probadas (5 mM de cafeína), aunque las dos cepas presentan disminución del crecimiento por arresto celular en G2, la carencia del gen RAD52 evita que el daño ocasionado pueda ser reparado de manera eficiente en la mutante, lo cual no sucede en la cepa parental. Sin embargo, el que no se hayan presentado cambios en el crecimiento de los cultivos con cafeína tras la adición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede deberse a que a las 12 h de incubación (mitad de la fase log), aunque es una fase en la que las células son metabólicamente más activas y por lo tanto más susceptibles a sufrir daños, la cantidad de células en división celular es probablemente suficiente para contrarrestar el efecto de la adición de un agente oxidante como el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para probar esta hipótesis se decidió realizar una serie de ensayos que permitiesen determinar si antes de entrar a la etapa de crecimiento exponencial, la

cafeína era capaz de despertar o condicionar una respuesta antioxidante en las células de *Y. lipolytica* haciéndolas más resistentes al daño ocasionado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En esta evaluación las cepas P01A,  $\Delta$ ku80 y  $\Delta$ rad52 se incubaron en medio YPD con cafeína (5 mM) solo por 3 h, y posteriormente se adicionó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los medios, además se incluyó para cada cepa un control para comparar si la mezcla simultáneamente de cafeína y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> favorecía el crecimiento de las cepas.

El tratamiento previo con cafeína (3 h) no generó una respuesta de defensa en ninguna de las cepas después de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya que el crecimiento de las cepas fue menor que el de los cultivos control (incubados solo en medio YPD o en presencia de cafeína). Por otra parte, cuando las células se incubaron desde el principio del experimento con la mezcla cafeína-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se observó una notable disminución del crecimiento de las cepas en comparación a los cultivos control. Estos resultados sugieren que la cafeína generó un efecto dañino aditivo al ocasionado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ya que propició una mayor disminución del crecimiento de las cepas en comparación con las otras condiciones probadas en esta fase, especialmente sobre la cepa  $\Delta$ rad52 ya que, a diferencia de ésta, las cepas P01A y  $\Delta$ ku80 mostraron una recuperación de su crecimiento después de 34 h de incubación.

Aunque el efecto protector de la cafeína ha sido asociado con la captura o inhibición de radicales OH<sup>•</sup>, las observaciones realizadas en este trabajo muestran que la cafeína no propició un efecto protector para las cepas de *Y. lipolytica* cuando fueron sometidas al efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Por otra parte, cuando se probó la combinación cafeína-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mostró un efecto aditivo dañino, lo cual hace que estos resultados se inclinen a los reportados en otros estudios donde se ha involucrado a la cafeína en la participación del tratamiento del cáncer, proponiendo que cuando la cafeína es combinada con un agente causante de daño al ADN, el efecto de dicho agente se potencializa (Bode & Dong, 2007). Estos resultados podrían ser parte de una visión prometedora sobre el diseño de moléculas con efectos

similares al de la cafeína que puedan ser utilizados en el tratamiento de enfermedades como el cáncer.

El desarrollo de este estudio se enfocó en probar si la cafeína tenía efecto genotóxico o antioxidante incluyendo como modelo de estudio, además de la cepa parental de *Y. lipolytica* (P01A), cepas mutantes deficientes en los procesos de reparación del ADN ( $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$ ). Los resultados obtenidos muestran que en las condiciones probadas (5 mM de cafeína y de  $H_2O_2$ ), la cafeína tiene un efecto citotóxico sobre las tres cepas de *Y. lipolytica* el cual es más notorio sobre las cepas mutantes, lo que nos lleva a pensar que este efecto citotóxico se debe al daño que la cafeína ocasiona al ADN (efecto genotóxico). Sin embargo, es importante aclarar que las concentraciones utilizadas en este estudio no son fáciles de alcanzar en tejidos de organismos como los humanos ya que la célula cuenta con mecanismos de eliminación o bombas de expulsión de cafeína que evitan que las concentraciones se eleven hasta alcanzar los niveles probados en este trabajo (5 mM); por lo que es posible que concentraciones menores de cafeína en mamíferos u otros modelos celulares tenga los efectos favorables que le han sido atribuidos por otros autores.

## 9. CONCLUSIONES

Los efectos de la cafeína han sido investigados sobre diversos modelos celulares, sin embargo, existe controversia sobre los efectos genotóxico y antioxidante que se le han atribuido.

En este trabajo, utilizando un modelo de células de levadura deficientes en los mecanismos de reparación del ADN, se encontró que:

- La cafeína prolonga los tiempos de duplicación de las cepas P01A,  $\Delta ku80$  y  $\Delta rad52$  de *Y. lipolytica*.
- La cafeína tiene un efecto citotóxico a juzgar por la capacidad que tiene de inhibir el crecimiento de las 3 cepas de *Y. lipolytica*.
- Cuando se incubaba con cafeína, la disminución del crecimiento de las cepas de *Y. lipolytica* es mayor en las cepas mutantes, lo que es un indicio de que la cafeína ejerce un efecto genotóxico.
- El efecto inhibitorio del crecimiento por acción de la cafeína es más marcado en la cepa mutante *rad52*, deficiente en la reparación del ADN por recombinación homóloga.
- Se sugiere que la cafeína tiene un efecto dañino aditivo sobre el crecimiento de *Y. lipolytica*, ya que al mezclarse con el  $H_2O_2$  la inhibición del crecimiento de las tres cepas fue mayor que al ser incubadas con ambos agentes de manera independiente.
- Al pre-incubar los cultivos con cafeína no se observó un efecto protector (antioxidante) al daño ocasionado por  $H_2O_2$ .

Las evidencias mostradas en este trabajo confirman un efecto citotóxico de la cafeína, acorde a los resultados encontrados en otros estudios. Se sugiere que la citotoxicidad se debe a un efecto genotóxico (daño al ADN) de la cafeína, a juzgar por el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de las cepas deficientes en los mecanismos de reparación del ADN.

## 10. LITERATURA CITADA

Abreu, R. V., Silva-Oliveira, E. M., Moraes, M. F.D., Pereira, G. S., & Moraes-Santos, T. (2011). Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 99 (4), 659–664.

Acheson, K., Gremaud, G., Meirim, I., Montigon, F., Krebs, Y., Fay, L., Gay, L., Schneiter, P., Schindler, C. & Tappy, L. (2004). Metabolic effects of caffeine in humans: lipid oxidation or futile cycling. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 40–46.

Ames, B., Gold, L., & Willett, W. (1995). The causes and prevention of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 92, 5258–5265.

Andaluz, E., Ciudad, T., Gómez-Raja, J., Calderone, R., & Larriba, G. (2006). Rad52 depletion in *Candida albicans* triggers both the DNA-damage checkpoint and filamentation accompanied by but independent of expression of hypha-specific genes. *Molecular Microbiology*, 59 (5), 1452-1472.

Arab, J. & Blumberg, L. (2008). Introduction to the proceedings of the fourth international scientific symposium on tea and human health. *The Journal of Nutrition*, 138, 1526–1528.

Ballard, T., Halaweish, F., Stevermer, C., Agrawal, P., & Vukovich, M. (2006). Naringin does not alter caffeine pharmacokinetics, energy expenditure, or cardiovascular haemodynamics in humans following caffeine consumption. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 33, 310–314.

Bartek, J., & Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology*, 19 (2), 238-45.

Bartosz, G. (2009). Reactive oxygen species: destroyers or messengers?. *Biochemical Pharmacology*, 77, 1303–1315.

Bhatia-Kissová, I. & Camougrand, N. (2010). Mitophagy in yeast: actors and physiological roles. *FEMS yeast research*, 10, 1023–1034.

Bienert, G., Schjoerring, J. & Jahn, T. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 994–1003.

Blanchard, J. & Sawers, S. (1983). The absolute bioavailability of caffeine in man. *European Journal Clinical Pharmacology*, 4, 93–98.

Blandini, F., Nappi, G., Tassorelli C. & Martignoni, E. (2000). Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Experimental Neurobiology*, 62, 63–88

Block, W., Merkle, D., Meek, K., & Lees-Miller, S. (2004). Selective inhibition of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) by the radiosensitizing agent caffeine. *Nucleic Acids Research*, 32 (6), 1967–1972.

Bode, A. M., & Dong, Z. (2007). The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer letters*, 8,247 (1), 26-39.

Burhans, W. & Weinberger, M. (2012). DNA damage and DNA replication stress in yeast models of aging. *Sub-cellular biochemistry*, 57, 187–206.

Calvo, I. A., Gabrielli, N., Iglesias, I., García, S., Hoe, K., Kim, D., 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*. 12; 4(8): e66.

Campos-Góngora, E., Andaluz, E., Bellido, A., Ruiz-Herrera, J., & Larriba, G. (2013). The RAD52 ortholog of *Yarrowia lipolytica* is essential for nuclear integrity and DNA repair. *FEMS Yeast Research*. 13 (5), 441-452.

Beverage Spectrum (2008). *Channel Check*, 6, 14–17.

Charles, B., Townsend, S., Steer, P., Flenady, V., Gray, P. & Shearman, A. (2008). Caffeine citrate treatment for extremely premature infants with apnea:

population pharmacokinetics, absolute bioavailability and implications for therapeutic drug monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring*, 30, 709–716.

Chen, X., Ghribi, O., & Geiger, J. D. (2010). Caffeine protects against disruptions of the blood-brain barrier in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 20 (1), S127-141

Chvasta, T. & Cooke, A. (1971). Absorption and emptying of caffeine from the human stomach. *Gastroenterology*, 61, 838–843.

Ciudad, T., Andaluz, E., Steinberg-Neifach, O., Lue, N. F., Gow, N. A., Calderone, R. A., & Larriba, G. (2004) Homologous recombination in *Candida albicans*: role of CaRad52p in DNA repair, integration of linear DNA fragments and telomere length. *Molecular Microbiology*, 53 (4), 1177-1194.

Clemenson, C., & Marsolier-Kergoat, M. C. (2009). DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery. *DNA Repair (Amst)* 8: 1101–1109.

Cornelis, M. & El-Sohemy, A. (2007). Coffee, caffeine, and coronary heart disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10, 745–751.

Costa, V. & Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 217–246.

Cysneiros, R., Farkas, D., Harmatz, J., Von Moltke, L. & Greenblatt, D. (2007). Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between zolpidem and caffeine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82, 54–62.

Dallas, C., Gerbi, A., Tenca, G., Juchaux, F., & Bernard, F. (2008). Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 15, 783–792.



Davies, D. B., Veselkov, D.A., Evstigneev, M. P., & Veselkov, A. N. (2001). "Self-association of antitumour agent Novantrone (Mitoxamtrone) and its hetero-association with Caffeine," *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II*, 1, 61–67.

Delaunay, A., Isnard, A. D., & Toledano, M.B. (2000). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *The EMBO Journal*, 19, 5157-5166.

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., & Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> receptor and redox transducer in gene activation. *Cell Press*, 111, 471-481.

Deplanque, G., Céraline, J., Lapouge, G., Dufour, P., Bergerat, J., & Klein-Soyer, C. (2004). Conflicting effects of caffeine on apoptosis and clonogenic survival of human K1 thyroid carcinoma cell lines with different p53 status after exposure to cisplatin or UVc irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314 (4), 1100–1106.

Devasagayam, T., Kamat, J., Mohan, H., & Kesavan, P. (1996). Caffeine as an antioxidant: Inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species in rat liver microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1282, 63–70.

Doherty, M. & Smith, P. (2004). Effects of caffeine ingestion on exercise testing: a meta-analysis. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 14, 626–46.

Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology & Medicine*, 11 (1), 81-128.

Farrugia, G., & Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology [electronic resource]*, 2, 64.

Ferre, S. (2008). An update in the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Neurochemistry*, 105, 1067–1079.

Finn, K., Lowndes, N., & Grenon, M. (2012). Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 1447–1473.

Fisone, G., Borgkvist, A. & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 857–872.

Flanagan, R. J., Braithwaite, R. A., Brown, S. S., Widdop, B. & de Wolff, F. A. (1995). International Programme on Chemical Safety. Basic Analytical Toxicology. *World Health Organization*. Recuperado 18 septiembre 2013 de: [http://www.who.int/ipcs/publications/training\\_poisons/basic\\_analytical\\_tox/en/](http://www.who.int/ipcs/publications/training_poisons/basic_analytical_tox/en/)

Gasch, A., Spellman, P., Kao, C., Carmel-Harel, O., Eisen, M., Storz, G., Botstein, D., & Brown, P. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of The Cell*, 11, 4241–4257.

Goldman, S., Taylor, R., Zhang, Y., & Jin, S. (2010). Autophagy and the degradation of mitochondria. *Mitochondrion*, 10, 309–315.

Greenberg, J., Boozer, C., & Geliebter A. (2006). Coffee, diabetes, and weight control. *The American journal of Clinical Nutrition*, 84, 682–693.

Griffin, M. (2006). “Coffe history.” Coffe Research Institute. Recuperado 20 noviembre de 2012 de: <http://www.coffeeresearch.org/coffee/history.htm>

Halliwell, B. & Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th Edn. Oxford: Oxford University Press.

Han, W., Ming, M., & He, Y.-Y. (2011). Caffeine promotes ultraviolet B-induced apoptosis in human keratinocytes without complete DNA repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (26), 22825–22832.

Harman, D. (1981). The aging process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7124-7128.

Harper, J. W., & Elledge, S. J. (2007). The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell*, 28, 739–745.

Harrison, J. C. & Haber, J. E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annual Review of Genetics*, 40, 209–235.

Heckman, M., Weil, J., & Gonzalez de Mejia, E. (2010). Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *Journal of Food Science*, 75 (3), R77-87.

Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46 (2), 101-23.

Higaki, K., Choe, S., Lobenberg, R., Welage, L., & Amidon, G. (2008). Mechanistic understanding of time-dependent oral absorption based on gastric motor activity in humans. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 313–25.

Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57, 267-272.

Holt, L., Tuch, B., Villen, J., Johnson, A., Gygi, S. & Morgan, D. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science*, 325 (5948), 1682–1686.

Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14 (16), 1511-1527.

Johnson, C. W., Timmons, D. L., & Hall, P. E. (2002). *Essential Laboratory Mathematics: Concepts and Applications for the Chemical and Clinical Laboratory* (pp.57-58). Canada. Second edition. THOMSON DELMAR LEARNING.

Kaplan, G., Greenblatt, D., Ehrenberg, B., Goddard, J., Cotreau, M., Harmatz, J. & Shader, R. (1997). Dose dependent pharmacokinetics and psychomotor effects of caffeine in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*, 37, 693–703.

Kissová, I., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Manon, S. & Camougrand, N. (2007). Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy*, 3 (4), 329-336.

Klionsky, D. J., Codogno, P., Cuervo, A. M., Deretic, V., Elazar, Z., Fueyo-Margareto, J., Gewirtz, D. A., Kroe-mer, G., Levine, B., Mizushima, N., Rubinsztein, D. C., Thumm, M. & Tooze, S. A. (2010). A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. *Autophagy*, 6, 438–448.

Kovacs, E., Lejeune, M., Nijs, I. & Westerterp-Plantenga, M. (2004). Effects of green tea on weight maintenance after body weight loss. *The British Journal of Nutrition*, 91, 431–437.

Kretzschmar, A, Otto, C., Holz, M., Werner, S., Hübner, L., & Barth, G. (2013). Increased homologous integration frequency in *Yarrowia lipolytica* strains defective in non-homologous end-joining. *Current genetics*, (1-2), 63-72.

Lee C. (2000) Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 295 (1-2), 141-154.

León-Carmona, J., & Galano, A. (2011). Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? *The Journal of Physical Chemistry*. B.115 (15), 4538–4546.

Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362 (6422), 709–715

Lopes, M., Mota M, & Belo, I. (2013). Comparison of *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* cellular response to different agents of oxidative stress. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 170 (2), 448-458.

Lorist, M. & Tops, M. (2003). Caffeine, fatigue and cognition. *Brain and Cognition*, 53, 82–94.

Magkos, F. & Kavouras, S. (2005). Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Critical Review Food Science Nutrition*, 45 (7-8), 535-562.

Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*. 23, 2:535-562.

Mercer, J., Gray, K., Figg, N., Kumar, S., & Bennett, M. (2012). The methyl xanthine caffeine inhibits DNA damage signaling and reactive species and reduces atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32 (10), 2461–2467.

Moser, B. A., Brondello, J. M., Baber-Furnari, B., & Russell, P. (2000) Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 4288–4294.

National Center for Biotechnology Information (2004). PubChem Compound Chemical Structure [CID 2519]. Recuperado 25 de noviembre de 2012 de: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=24892984&viewopt=PubChem>

Nawrot, P., Jordan, S., Eastwood, J., Rotstein, J., Hugenholtz, A. & Feely, M. (2003). Effects of caffeine on human health. *Food Additive Contaminat*, 20, 1–30.

Nicaud, J. (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29 (10), 409-418.

Ogawa, H. & Ueki, N. (2007). Clinical importance of caffeine dependence and abuse. *Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 61, 263–268.

O'Neil, M. (2006). The Merck Index- An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. (14th edition) Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc.

Organización Mundial de la Salud (1991) Monografías IARC (Agencia de investigación sobre el cáncer) sobre la evaluación del riesgo carcinogénico para los humanos: Cafeína. Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización de la Salud Mundial-51.

Pérez-Campo, F. M., & Domínguez, A. (2001). Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 43 (6), 429-433.

Perrone, G., Tan, S. & Dawes, I. (2008). Reactive oxygen species and yeast apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783 (7), 1354–1368.

Prasanthi, J., Dasari, B., Marwarha, G., Larson, T., Chen, X., Geiger, J., & Ghribi, O. (2010) Caffeine protects against oxidative stress and Alzheimer's disease-like pathology in rabbit hippocampus induced by cholesterol-enriched diet. *Free Radical Biology & Medicine*, 15, 49 (7), 1212-1220.

Reggiori, F. & Klionsky, D. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell*, 1, 11–21.

Reissig, C., Strain, E., & Griffiths, R. (2009). Caffeinated energy drinks: a growing problem. *Drug Alcohol Dependence*, 99, 1–10

Rosso, A., Mossey J., & Lippa, C. F. (2008). Caffeine: neuroprotective functions in cognition and Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 23 (5), 417-422.

Sabisz, M., & Skladanowski, A. (2008). Modulation of cellular response to anticancer treatment by caffeine: inhibition of cell cycle checkpoints, DNA repair and more. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9 (4), 325–336.

Salmon, T., Evert, B., Song, B. & Doetsch, P. (2004). Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 32, 3712–3723.

Saran, M. & Bors, W. (1991). Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Wien Klin Wochenschr*, 69, 957–964.

Sayre, L., Perry, G. & Smith, M. (2008). Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 21 (1), 172-188

Somogyi, L. (2010). Caffeine intake by the U.S. population. *The Food and Drug Administration*. Oakridge National Laboratory. Recuperado septiembre 2013 de: <http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofFoods/CFSAN/CFSANFOIAElectronicReadingRoom/UCM333191.pdf>

Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J. D., Dean, C., Ma, H., & Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & Development*, 9, 1797–1810.

Takeshi, H. & Kazuyoshi, T. (2011). Food Factors and Oxidative DNA Damage/DNA Repair Systems, "Selected Topics in DNA Repair", Clark C. Chen (Ed.), University of California, San Diego, USA, ISBN 978-953-307-606-5.

Temple, M., Perrone, G. & Dawes, I. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends in Cell Biology*, 15, 319–326.

Trevitt, J., Kawa, K., Jalali, A. & Larsen, C. (2009). Differential effects of adenosine antagonists in two models of Parkinsonian tremor. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 94, 24–29.

Turk, M., Yang, K., Hravnak, M., Sereika, S., Ewing, L. & Burke, L. (2009). Randomized clinical trial of weight loss maintenance. *Journal of Cardiovascular Nursing*, 24, 58–80.

Ubersax, J., Woodbury, E., Quang, P., Paraz, M., Blethrow, J., Shah, K., Shokat, K. & Morgan, D. (2003) Targets of the cyclin dependent kinase Cdk1. *Nature*, 425 (6960), 859–864

Van Dam, F. & Hu, R. (2005). Coffee consumption and risk of type 2 diabetes. *Lancet*, 294, 97–104.

Varma, S. & Hegde, K. (2010a). Kynurenine-induced photo oxidative damage to lens in vitro: protective effect of caffeine. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 340 (1-2), 49-54.

Varma, S., & Hegde, K. (2010b). Prevention of oxidative damage to lens by caffeine. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: the Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 26 (1), 73–77.

Verbeke, J., Beopoulos, A., & Nicaud, J. M. (2013). Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnology letters*, 35 (4), 571-576.

Vergara, R., Parada, F., Rubio, S., & Pérez, F. (2012). Hypoxia induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and activates antioxidant defence system in grape vine buds through mediation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene. *Journal of experimental botany*, 94, 1–9.

Vignoli, J., Bassoli, D., & Benassi, M. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, (3), 863-868.

Wang, H., Boecker, W., Wang, H., Wang, X., Guan, J., Thompson, L. H., Nickoloff, J., & Iliakis G. (2004). Caffeine inhibits homology-directed repair of I-SceI-induced DNA double-strand breaks. *Oncogene*, 23 (3), 824–834.

Weinberg, B. & Bealer, B. (2002). *The World of Caffeine: The Science and Culture of the World's Most Popular Drug*.



Westerterp-Plantenga, M., Lejeune, M. & Kovacs, E. (2005). Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. *Obesity research*, 13, 1195–1204.

Young lab University of Washington (2004). *Yeast protocols*. Recuperado 20 de agosto de 2014 de: <http://depts.washington.edu/younglab/yeastprotocols%28htm%29/Yeastculture.htm>

Zechmann, B., Liou, I. C., Koffler, B. E., Horvat, I., Tomašić, A., Fulgosi, H. & Zhang, Z. (2011). Subcellular distribution of glutathione and its dynamic changes under oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 11, 631-642.

Zong, W. X. & Thompson, C. B. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development*, 20, 1–15.

## RESUMEN CURRICULAR

LN. Evelyn Sifuentes Gaspar

Candidata para el Grado de  
Maestro en Ciencias en Nutrición

Tesis: EFECTO GENOTÓXICO DE LA CAFEÍNA SOBRE CÉLULAS DE *Yarrowia lipolytica* DEFICIENTES EN LOS MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN.

Campo de estudio: Nutrición molecular

Datos personales: nacida en Fresnillo, Zacatecas el 19 de diciembre de 1987, hija de Gustavo Sifuentes Trujillo y Ma. Leonor Gaspar Orenday.

Educación: egresada de la Universidad Autónoma de Zacatecas; grado obtenido Licenciada en Nutrición en 2010; segundo lugar de la generación.

Experiencia profesional: docente becario por asignatura en la Licenciatura en Nutrición de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL.

Reconocimientos: tercer lugar en la categoría de trabajos libre de investigación en cartel con el trabajo "Efecto de la cafeína sobre el crecimiento de *Yarrowia lipolytica*" en el XXIX congreso de la AMMFEN 2014, obtención del tercer lugar de la generación 2012-2014 de la Maestría en Ciencias en Nutrición de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL.