



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DEL TIPO DE TOSTADO Y
PREPARACIÓN DE *Coffea arabica* EN LA
PREVENCIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN
Caenorhabditis elegans”**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener

El título profesional de

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta

BRIANDA LIZBETH PAZ CRUZ

Director de tesis

D.C. Josué Altamirano Hernández



Morelia, Michoacán, febrero 2022

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Sintética del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D.C. Josué Altamirano Hernández.

Agradecimientos

A **Dios** y al **Universo** por darme la fortaleza de poder lograr mi objetivo.

A mis **padres** y mis **hermanos**, que a pesar de la distancia nunca me dejaron de apoyar y de impulsarme a dar siempre lo mejor de mí, los amo con todo mi corazón. A mi **novio** y su familia por sus consejos, apoyo y comprensión.

Agradezco especialmente a mi **asesor** D.C Josué Altamirano Hernández, y a mi **Co-asesor** M.C Alejandra Yitzel Guzmán Hernández por dejarme ser parte de su equipo de trabajo, por el apoyo brindado a mi investigación, pero sobre todo por su paciencia infinita.

A mis **sinodales** D.C Asdrúbal Aguilera Méndez y D.C Mauro Martínez Pacheco, por su gran aporte y consejos para que este trabajo sea mejor.

Un agradecimiento especial para el D.C Mario Armando Gómez Hurtado y a su estudiante de doctorado Antonio Ferreira, al D.C José Juan Virgen Ortiz y al Licenciado en Biotecnología Aldo Guerrero Ramírez por permitirme usar sus equipos de trabajo y colaborar a esta investigación.

Agradezco a mis amigos: Melissa, Adrián y Andrea por su apoyo en todo momento, a mi equipo de trabajo Dennis, Fanny y Katia por su dedicación y paciencia sin su ayuda no hubiera sido posible gran parte de esto.

A. ÍNDICE GENERAL

B. ÍNDICE DE FIGURAS

C. ÍNDICE DE TABLAS

D. NOMENCLATURA

Abreviaturas

Griegos

E. RESUMEN 1

F. ABSTRAC 2

I. INTRODUCCIÓN 3

II. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades crónico-degenerativas 5

2.2 Enfermedades neurodegenerativas 5

2.3 Enfermedad de Alzheimer 6

2.4 Enfermedad de Parkinson 7

2.5 Estrés oxidante en las enfermedades neurodegenerativas 8

2.5.1 Generación de especies reactivas de oxígeno 8

2.5.2 Generación de especies reactivas de oxígeno en el cerebro 8

2.5.3 Sistema de defensa antioxidante 9

2.6 Tratamientos farmacológicos para tratar la enfermedad de Alzheimer y sus desventajas 10

2.6.1 Tratamientos farmacológicos para tratar la enfermedad del Parkinson y sus desventajas 10

2.7 Tratamientos alternativos no farmacológicos en las enfermedades neurodegenerativas 11

2.7.1 Resveratrol 13

2.7.2 Curcumina 14

2.8 Composición química del café 19

2.8.1 Ácidos clorogénicos 20

2.8.2 Principal fuente de obtención de la cafeína 21

2.8.3 Actividad farmacológica de las xantinas 22

2.8.4 Como influye el procesamiento del café (*Coffea arabica*),

en su perfil químico	23
2.8.5 Principales métodos de elaboración de café (<i>Coffea arabica</i>)	23
2.9 <i>Caenorhabditis elegans</i> como organismo modelo	24
2.9.1 Estrategias de defensa frente al estrés oxidativo en <i>C. elegans</i>	25
III Moléculas de bajo peso molecular	
3.1 Sistema glutatión	26
3.1.1 Glutatión peroxidasa (Gpx)	27
3.1.2 Proteínas y enzimas antioxidantes	27
3.1.3 Superóxido dismutasa (SOD)	27
3.1.4 Catalasa (CAT)	28
3.2 Factores de transcripción implicados en estrés oxidante	28
IV JUSTIFICACIÓN	31
V HIPÓTESIS	32
VI OBJETIVOS	32
6.1 OBJETIVO GENERAL	32
6.1.2 OBJETIVOS PARTICULARES	32
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	33
7.1 Material biológico <i>coffea arabica</i>	33
7.1.2 Cepas de <i>Caenorhabditis elegans</i> y condiciones de cultivo	33
7.1.3 Preparación y extracción de las muestras	33
7.2 Cuantificación de fenoles totales	34
7.3 Cuantificación de cafeína por HPLC	34
7.4 Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i>	34
7.4.1 Método DPPH	34
7.4.2 Método ABTS	35
7.4.3 Método FRAP	35
7.5 Sincronización de <i>C. elegans</i>	36
7.6 Ensayos de resistencia al estrés oxidativo en <i>C. elegans</i> con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	36
7.7 Análisis estadístico	36

VIII. RESULTADOS

8.1 Contenido de compuestos fenólicos en el café (<i>Coffea arabica</i>)	38
8.2 Contenido de cafeína en las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación.....	39
8.3 Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación, mediante la prueba de DPPH-	40
8.4 Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i> de las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación, mediante la prueba de ABTS +	41
8.5 Determinación de actividad antioxidante <i>in vitro</i> de las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación, mediante la prueba de FRAP	42
8.6 Efecto de los compuestos químicos del café gourmet e industrial, frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en <i>C. elegans</i> N2.....	43
8.7 Efecto de los compuestos químicos del café gourmet e industrial, frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en la cepa GR1339 <i>daf-2</i>	45
8.8 Efecto de los compuestos químicos del café gourmet e industrial, frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en la cepa CF1038 <i>daf-16</i>	47
IX. DISCUSIÓN	49
X. CONCLUSIÓN	53
XI. PERSPECTIVAS	54
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
XIII ANEXO	64

A. MEDIOS DE CULTIVO Y *BUFFER* UTILIZADOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Placas amiloides en cerebros de ratones y el efecto de las inyecciones de curcuminoides	15
Figura 2: Estructura química de las metilxantinas	22
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Caenorhabditis elegans</i>	25
Figura 4: Vía de señalización de la insulina en <i>C. elegans</i> . Esquema simplificado de la IIS-IGF-1.	29
Figura 5: Contenido de compuestos fenólicos en las infusiones de café gourmet e industrial por los distintos tipos de preparación	38
Figura 6: Cuantificación de cafeína por HPLC	39
Figura 7: Actividad antioxidante in vitro DPPH	40
Figura 8: Actividad antioxidante in vitro ABTS	41
Figura 9: Actividad antioxidante in vitro FRAP	42
Figura 10: Las infusiones de café protegen al nematodo <i>C. elegans</i> ante el estrés inducido químicamente con H ₂ O ₂ . (N2).	44
Figura 11: Las infusiones de café protegen al nematodo <i>C. elegans</i> ante el estrés inducido químicamente con H ₂ O ₂ . GR1339 (<i>daf-2</i>).	46
Figura 12: Las infusiones de café protegen al nematodo <i>C. elegans</i> ante el estrés inducido químicamente con H ₂ O ₂ . CF1038 (<i>daf-16</i>).	48

C. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Evaluación del impacto del aceite de coco en la evolución del Alzheimer para determinar si existe influencia en dicha mejora con variables como el sexo y la (DMII).....	12
Tabla 2: Evaluación del impacto del aceite de coco en la evolución del Alzheimer para determinar si existe influencia en dicha mejora con variables como el sexo.	12
Tabla 3: Alternativas no farmacológicas en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.	15
Tabla 4: Asociación entre el consumo de café y la demencia	18
Tabla 5: Composición química de granos de café almendra y tostado de variedades Arábica	19
Tabla 6: Número de compuestos químicos identificados en el café.	20
Tabla 7: Contenido de cafeína en 150 mL, según el tipo de café.	21

D. NOMENCLATURA

Abreviaturas

ABTS: 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

A β : péptido β -amiloide

AC: ácidos clorogénicos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ApoE ϵ 4: apolipoproteína E4

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

CAT: Catalasa

DAF: Formación anormal de Dauer

DMII: diabetes mellitus tipo 2

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

EA: enfermedad de Alzheimer

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico

ECD: enfermedades crónico degenerativas

ECV: enfermedades cardiovasculares

EDI: enzima degradadora de insulina

EN: enfermedades neurodegenerativas

EP: enfermedad de Parkinson

FOXO: forkhead box, sub-grupo O

FRAP: Poder Antioxidante Reductor de Fierro

FudR: Fluorodesoxiuridina

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GST: Glutación-S-transferasa

HPLC-DAD: Cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

IGF: Factor de crecimiento insulínico

NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NFT: agregados neurofibrilares intracelulares

NGM: Medio de crecimiento de nematodos

NRF: Factor nuclear eritroide

OH•: Radical hidroxilo

O₂•-: Radical superóxido

Anión súper óxido (O₂)

pH: Potencial de hidrogeniones

RL: radical libre

RE: retículo endoplasmático

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Especies Reactivas del Nitrógeno

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

RSS: Especies Reactivas del Azufre

SKN: SKiNhead

SOD: Superóxido dismutasa

SOD/CuZn: Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc

SOD/Mn: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso

SNP: síntoma neuropsiquiátrico

Griegos

μ: micro (1x10⁻⁶)

α: alfa

β: beta

E. RESUMEN

El consumo de café (*Coffea arabica*) se ha asociado con importantes actividades biológicas en la prevención y el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, debido a sus compuestos químicos, principalmente esta protección se atribuye a los ácidos clorogénicos, los cuales exhiben una importante actividad antioxidante y a la cafeína, una xantina estimulante del sistema nervioso central, estos compuestos pueden prevenir o retrasar algunos tipos de daños a las células neutralizan los radicales libres generados por el metabolismo de las células y el estrés oxidante. El interés de este proyecto es evaluar si la preparación y el tipo de tostado de la semilla de café influyen sobre sus propiedades protectoras, para lo cual se realizó la preparación de café verde, tostado claro, oscuro, café soluble industrial y café descafeinado, por el método de infusión y cafetera de vapor. Los compuestos fenólicos se cuantificaron mediante el método de *Folin-Ciocalteu* y la actividad antioxidante *in vitro* se determinó mediante las técnicas DPPH⁻, ABTS⁺ y FRAP, asimismo se determinó el contenido de cafeína por la técnica de HPLC. Los resultados muestran que el COI tiene una concentración total de fenoles de 37.76 mg de EAG g⁻¹, en su preparación por infusión y 40.42 mg de EAG g⁻¹ en su preparación por cafetera de vapor presentan valores superiores de hasta el 30% con respecto a otros tipos de café, como el café verde (CVI), y el café soluble industrial (NCI) los cuales presentaron 25 y 30 mg de EAG g⁻¹, respectivamente, no obstante en las pruebas antioxidantes *in vitro*, de DPPH⁻ y FRAP, el café NCI mostró una mejor actividad antioxidante mayor al 50% con respecto al café oscuro. En la determinación de cafeína por la técnica de HPLC, NCI mostró el mayor contenido de cafeína con 108.04 µg/mL, lo cual puede justificar su actividad antioxidante en las pruebas *in vitro*. En las pruebas *in vivo*, obtuvimos que el café industrial, por una preparación por infusión ofrece una mejor capacidad protectora ante el estrés oxidativo inducido químicamente con peróxido de hidrógeno con una sobrevivencia de la población de *C. elegans* del 70%, lo cual nos indica que actúa de manera indirecta modulando genes de la vía de señalización de la insulina los cuales están involucrados en la vida útil de *C. elegans*.

Palabras clave: (Cafeína, peróxido de hidrógeno, protección, antioxidante)

F. ABSTRAC

The consumption of coffee (*Coffea arabica*) has been associated with important biological activities in the prevention and treatment of chronic-degenerative diseases, due to its chemical compounds, mainly this protection is attributed to chlorogenic acids, which exhibit important antioxidant activity and caffeine, a central nervous system stimulant xanthine, these compounds may prevent or delay some types of cell damage by neutralizing free radicals caused by cell metabolism and oxidative stress. The interest of this project is to evaluate if the preparation and the type of roasting of the coffee seed influence its protective properties, for which the preparation of green coffee, light roasted, dark, industrial soluble coffee and decaffeinated coffee was carried out by the method of infusion and steam coffee. The phenolic compounds were quantified by the Folin-Ciocalteu method and the *in vitro* antioxidant activity was tested by the DPPH-, ABTS+ and FRAP techniques, the caffeine content was determined by the HPLC technique. The results showed that dark roasted coffee had a total concentration of phenols of 37.76 mg of EAG g⁻¹, in its preparation by infusion and 40.42 mg of EAG g⁻¹ in its preparation by steam coffee maker, presenting higher values of up to 30 % with respect to other types of coffee, such as green coffee (CVI), and industrial soluble coffee (NCI), which presented 25 and 30 mg of EAG g⁻¹, respectively, despite *in vitro* antioxidant tests, of DPPH- and FRAP, coffee (NCI) showed better antioxidant activity greater than 50% compared to dark coffee. In the determination of caffeine by HPLC technique, (NCI) showed the highest caffeine content with 108.04 µg/mL, which may justify its antioxidant activity in *in vitro* tests. In the *in vivo* tests, we obtained that industrial coffee, through an infusion preparation, offers a better protective capacity against oxidative stress chemically induced with hydrogen peroxide with a survival of *C. elegans* population of 70%, which indicates that it acts in an indirectly modulating insulin signaling pathway genes, which are involved in the lifespan of *C. elegans*.

Keywords: (Caffeine, hydrogen peroxide, protection, antioxidant)

I. Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas resultan en la degeneración progresiva y/o muerte de las células nerviosas (Van Bulk y col., 2019), funcionalmente se caracterizan por un declive progresivo de las funciones cognitivas (Carvajal, 2016), afecta varias actividades que el cuerpo realiza, como el equilibrio, movimiento, hablar, respirar y funciones del corazón. La etiología de estas fisiopatologías aún no ha sido completamente dilucidada; sin embargo, el aumento del estrés oxidativo ha sido sugerido como unas de las potenciales etiologías (Kim y col., 2015). En la actualidad no hay cura para estas enfermedades, solo existen fármacos los cuales pueden ayudar a controlar o retrasar la progresión de estas. Algunos tratamientos ayudan a controlar o disminuir los síntomas de la enfermedad; sin embargo, estos fármacos generan efectos secundarios adversos, afecta la calidad de vida de los pacientes (Brightfocus, 2017). Por lo anterior, se han buscado alternativas naturales para retardar o disminuir la progresión y el cuadro clínico, mejora la calidad de vida de los pacientes.

Una de las alternativas naturales que ha llamado la atención es el café, ya que es una bebida de carácter universal que se consume en todos los países del mundo, se ha descubierto que está compuesto por más de mil sustancias químicas entre las cuales destacan: aminoácidos, azúcares, vitaminas y minerales. Además, la composición del café también incluye ácidos clorogénicos con propiedades antioxidantes y la cafeína, una xantina con propiedades estimulantes del sistema nervioso central (Gottleland, y de Pablo. 2007); estos compuestos pueden prevenir o retrasar algunos tipos de daños a las células neutraliza los radicales libres causados por el metabolismo de las células y el estrés oxidativo (Mayor-Oxilia., 2010). El sabor y el aroma del café se desarrollan durante el tueste, los compuestos volátiles aromáticos se forman gracias a la transformación de los químicos que están presentes naturalmente en los granos de café verde, de igual manera la elección del método de preparación influye en cuántos de cada uno de estos compuestos químicos están presentes en la bebida, lo cual tiene un efecto precursor en su actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo* tostado (Perfect Daily Grind, 2019). En este trabajo se evaluará el efecto antioxidante en cuanto a la preparación y tipo de tostado de *Coffea arabica* en el modelo biológico *Caenorhabditis*

elegans, el cual ha demostrado ser un excelente organismo modelo de estudio, ya que desde su introducción se ha utilizado ampliamente para investigar importantes procesos biológicos como el desarrollo, envejecimiento, neurobiología y diversas patologías crónico-degenerativas (Markaki y Tavernarakis, 2010). Por lo cual, el presente trabajo contribuirá con información científica sobre el efecto de tipo de café y su preparación en la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Enfermedades crónicas-degenerativas

Las enfermedades crónico-degenerativas (ECD), son aquellas que van degradan física y/o mentalmente a quienes las padecen, provocan un desequilibrio y afectan órganos y tejidos; estas pueden ser congénitas y suelen manifestarse a edades avanzadas, aunque también pueden afectar jóvenes de entre 20 y 40 años. Entre las ECD se encuentran: la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), enfermedades cardiovasculares (ECV), las enfermedades neurodegenerativas Alzheimer y Parkinson, por mencionar algunas. Las ECD comprenden un problema de salud pública que aqueja a la población en general, por lo que surge la necesidad de generar estrategias confrontadoras para estas enfermedades. Entre las enfermedades crónico degenerativas, en los últimos años han destacado las neurodegenerativas debido a su prevalencia (Secretaria de Salud, 2015).

2.2 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas (EN) afectan a alrededor de mil millones de personas en todo el mundo, son condiciones incurables y debilitantes que resultan en la degeneración progresiva y/o muerte de las células nerviosas (Van Bulck y col., 2019), estos cambios en el cerebro humano pueden llevar al declive cognitivo, afecta varias actividades que el cuerpo realiza a diario, como el equilibrio, movimiento, hablar, respirar y funciones del corazón (Kim y col., 2015).

Debido a la gran variedad de EN, características patológicas, síntomas y tratamientos, hace que sea muy difícil clasificarlas en términos generales; sin embargo, un parámetro a considerar es la prevalencia, de acuerdo con esto, hay dos enfermedades neurodegenerativas más prevalentes: la enfermedad de Alzheimer (EA) y la enfermedad de Parkinson (EP) (Van Bulck y col., 2019). En 2019 se estimó que hay más de 50 millones de personas con Alzheimer (Alzheimer's Disease International, 2019) y más de 7 millones de personas con Parkinson en todo el mundo (UNAM, 2019).

Estas enfermedades pueden surgir de una combinación de factores genómicos, epigenómicos, metabólicos y ambientales (Van Bulck y col., 2019). La etiología de estas fisiopatologías aún no ha sido completamente dilucidada; sin embargo, el aumento del estrés oxidativo ha sido sugerido como una de las potenciales etiologías comunes en varias EN (Kim y col., 2015). Asimismo, dichas enfermedades se caracterizan por proteínas mal plegadas y agregados proteicos formados principalmente por una proteína específica que varía en cada enfermedad. En general, todas estas proteínas se caracterizan por dominios mal plegados, sin una estructura secundaria definida (Van Bulck y col., 2019), por lo anterior nos hemos interesado en estudiar las enfermedades neurodegenerativas EA y EP, ya que son enfermedades que van al alza y en la actualidad no hay cura para ellas, se busca retrasar la progresión de estas por medio de los compuestos naturales, en particular a través de los fitoquímicos del café.

2.3 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo caracterizado funcionalmente por un declive progresivo de las funciones cognitivas (Carvajal, 2016), comienza por afectar la memoria episódica y la memoria reciente, así como también presenta alteraciones de la denominación y de la fluencia verbal, entre otras. Además de los síntomas cognitivos, presenta síntomas neuropsiquiátricos (SNP). Éstos pueden aparecer desde etapas iniciales de la enfermedad; pueden ir desde apatía e indiferencia, hasta desinhibición y alucinaciones, entre otros. Se estima que hasta el 90% de las personas con Alzheimer presentará al menos un SNP a lo largo de la enfermedad (Gutiérrez y col., 2017). La EA patológicamente se caracteriza por la pérdida de las sinapsis, la presencia de depósitos de placas extracelulares, agregados neurofibrilares intracelulares (NFT) y también por una severa gliosis (proliferación y activación de la microglía y de los astrocitos) en la corteza cerebral y en el hipocampo. Además de estas dos características se observa una deposición amiloide fibrilar en vasos cerebrales de pequeño y mediano tamaño (Carvajal, 2016).

En la EA aparecen dos tipos de agregados de proteínas:

1. Depósitos de placas extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$). El péptido $A\beta$ es el principal componente de los depósitos amiloides en el cerebro de pacientes con EA, este péptido es el producto de la digestión proteolítica de la proteína precursora del amiloide (APP) (Estrada y Zomosa, 2017).
2. Agregados intracelulares llamados ovillos neurofibrilares (NFT) formados por la proteína *tau* hiperfosforilada (van Bulck y col, 2019).

2.4 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común del sistema nervioso central seguida de la EA (Tysnes y col., 2017). En la EP, algunas células nerviosas (neuronas) en el cerebro se descomponen o mueren progresivamente. Muchos de los síntomas obedecen a una pérdida de las neuronas que producen dopamina, una especie de neurotransmisor en el cerebro. Cuando los niveles de dopamina disminuyen, causa una actividad cerebral anormal, lo que lleva a un deterioro del movimiento y otros síntomas característicos de la EP (Mayo Clinic, 2019) las características distintivas de esta enfermedad son bradiquinesia, rigidez muscular y temblor (Tysnes y col., 2017).

La EP se caracteriza neuropatológicamente por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas que se localizan en la sustancia nigra pars compacta (SNpc); estas células normalmente liberan dopamina en sus terminales axónicas en el cuerpo estriado y forman parte del sistema extrapiramidal de regulación motora, por lo mismo, su pérdida se traduce en los trastornos del movimiento (Gómez-Chavarín y col., 2012); además se caracteriza por un agregado de proteínas intracelulares los cuales son los Cuerpos de Lewy, los cuales se encuentran formados principalmente por la proteína alfa-sinucleína (van Bulck y col., 2019).

Existen evidencias que indican que el incremento de la generación de especies reactivas de oxígeno y un déficit de las defensas antioxidantes, son factores que

contribuyen principalmente al aumento de estrés oxidativo y posteriormente al desencadenamiento de enfermedades crónico-degenerativas.

2.5 Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas

El estrés oxidativo es una de las potenciales etiologías en las enfermedades neurodegenerativas, el cual es inducido por un desequilibrio en el estado redox, entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes, lo que resulta en una acumulación excesiva de ROS (Kim y col., 2015). Se considera radical libre (RL) a una molécula que en su estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad, para la molécula de oxígeno se conocen las siguientes especies reactivas llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS): Anión súper óxido (O_2^-), Radical hidroxilo (OH^\cdot), Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Oxígeno singlete (O_2°), por mencionar algunas (Mayor-Oxilia, 2010).

2.5.1 Generación de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O_2) por reducción química parcial (Kim y col., 2015), son producidas como una consecuencia del metabolismo aeróbico fisiológico normal. La cadena de transporte de electrones de la mitocondria, los peroxisomas, la NADPH oxidasa y el sistema del citocromo P450 son las fuentes más importantes de producción de los ROS; a niveles moderados son esenciales para la producción de energía, la síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis, un proceso crítico para el sistema inmunológico, también juegan un papel vital en la transducción de señales, que es importante para la comunicación y función de las células, tienen un papel indiscutible en los procesos fisiológicos habituales; sin embargo, al mismo tiempo, pueden ejercer efectos tóxicos cuando se encuentran en exceso (Kim y col., 2015).

2.5.2 Generación de especies reactivas de oxígeno en el cerebro

Dado que el cerebro es uno de los órganos metabólicamente más activos en el cuerpo, es vulnerable al estrés oxidativo, especialmente por las siguientes razones:

1. El cerebro tiene una alta demanda de oxígeno, constituye el 20% del consumo de oxígeno del cuerpo.
2. Los metales redox-activos como el hierro o el cobre existen en abundancia en el cerebro y están activamente implicados en la catálisis de la formación de ROS.
3. Los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados se encuentran en las membranas de las células cerebrales y reaccionan como sustratos para la peroxidación lipídica.
4. Hay niveles relativamente bajos de glutatión (GSH) en el cerebro, que juega un papel de antioxidante endógeno en la eliminación de ROS.

Lo cual puede inducir daño celular, deterioro del sistema de reparación del ADN, y disfunción mitocondrial, todos los cuales han sido conocidos como factores clave en la aceleración del proceso de envejecimiento y el desarrollo de trastornos neurodegenerativos (Kim y col., 2015).

El equilibrio intracelular entre los oxidantes y los antioxidantes está regulado por la producción de radicales libres por parte de las mitocondrias (cadena de transporte de electrones y diferentes enzimas), el retículo endoplasmático (RE), los peroxisomas o diferentes enzimas (por ejemplo, las oxidasas NADPH o las oxidasas de xantina), y la reducción de estos radicales libres por diferentes mecanismos antioxidantes, como el glutatión, la superóxido dismutasa, la catalasa. No obstante, en las EN, este equilibrio se rompe y se produce una situación de estrés oxidativo, debido principalmente a la disfunción mitocondrial que se produce en esta enfermedad, lo que provoca un elevado aumento de la producción de radicales libres, y los mecanismos antioxidantes celulares no pueden hacerle frente. Además, en el caso de la EA y EP, existen varios mecanismos patológicos que provocan un aumento del estrés oxidativo, como la activación de las oxidasas NADPH por los péptidos A β , con la consiguiente producción de radicales libres por parte de esta enzima (van Bulck y col., 2019).

5.2.3 Sistema de defensa antioxidante

Los antioxidantes son sustancias naturales o fabricadas por el hombre que pueden prevenir o retrasar algunos tipos de daños a las células neutralizan los radicales libres

(RL). El antioxidante al colisionar con el RL, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL. De lo dicho anteriormente se deduce que los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no. Estos se clasifican en endógenos, por ejemplo, glutatión (GSH), superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatiónperoxidasa (GPX) (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos, como vitamina C, vitamina E y betacarotenos (ingresan a través de la dieta) (MedlinePlus 2021).

2.6 Tratamientos farmacológicos para tratar la enfermedad de Alzheimer y sus desventajas

Si bien en la actualidad no hay cura para la EN, existen fármacos los cuales pueden ayudar a controlar o retrasar la progresión de esta. Algunos tratamientos ayudan a controlar la agitación, la depresión o los síntomas psicóticos (alucinaciones o delirios) que pueden ocurrir cuando la enfermedad progresa; sin embargo, estos fármacos generan efectos secundarios perjudican la calidad de vida de los pacientes, tal es el caso de los medicamentos para el Alzheimer entre estos medicamentos se encuentran los siguientes:

- Inhibidores de glutamato (Namenda®)
- Inhibidores de la degradación de la acetilcolina (Exelon®, Aricept®)

Por mencionar algunos, los cuales comparten los siguientes efectos secundarios, náuseas, pérdida de peso, dificultad para dormir y dolores de cabeza entre otros (Brightfocus, 2017).

2.6.1 Tratamientos farmacológicos para tratar la enfermedad de Parkinson y sus desventajas

Fármacos comúnmente empleados para controlar o retrasar la progresión del Parkinson y sus efectos secundarios adversos

- Manifestaciones motoras (Levodopa/Carbidopa®, Trihexifenidilo®)

- Disquinesias/Fluctuaciones (Amantadina®, Safinamida®)

Comparten los siguientes efectos secundarios: náuseas, deterioro cognitivo, sequedad de boca, estreñimiento, somnolencia y cefalea por mencionar algunos (Martínez-Fernández y col., 2016).

Es por ello que se han buscado alternativas naturales, las cuales ayuden a retrasar la progresión de la EA y EP, sin que desencadenen efectos secundarios como los ya antes mencionado.

2.7 Tratamientos alternativos no farmacológicos en las enfermedades neurodegenerativas

En 2015, Hu Yang y colaboradores evaluaron el impacto que tiene el aceite de coco en la evolución del Alzheimer, esto para determinar si existe influencia de manera favorable ante el Alzheimer, donde utilizaron variables como el sexo y la Diabetes mellitus tipo II (DMII), este estudio fue realizado en pacientes con Alzheimer, con un grupo control y un grupo de intervención al que se le administró 40 mL/día de aceite de coco extra virgen, en su resultados se observó en los sujetos que tomaban el producto un aumento estadísticamente significativo de la puntuación del test MEC-LOBO tabla 1, según el sexo y tabla 2, de acuerdo si el paciente presentaba DMII o no (Hu Yang y col., 2015) (el cual es un test de cribaje de demencias, útil en el seguimiento evolutivo de las mismas; en el cual se exploran 5 áreas cognitivas: Orientación, fijación, cálculo, memoria y lenguaje) (https://www.infogerontologia.com/documents/vgi/escalas/mini_mental.pdf).

Tabla 1: Evaluación del impacto del aceite de coco en la evolución del Alzheimer para determinar si existe influencia en dicha mejora, en donde emplearon variables como el sexo y la diabetes mellitus tipo II (DMII).

<i>Valores del deterioro cognitivo según la puntuación del test MEC-LOBO pre y post intervención según sexo</i>						
<i>Parámetros</i>	<i>Grupo de estudio</i>	<i>Sexo (n)</i>	<i>Inicio de estudio (DE)</i>	<i>Fin de estudio (DE)</i>	<i>Porcentaje de mejoría</i>	<i>P</i>
Promedio	Casos	Hombres (5)	14,60 (± 3,36)	20 (± 3)	36,99%	2.13E-0.2
		Mujeres (17)	10,73 (± 7,43)	14,99 (± 8,21)	39,70%	2.53E-05
	Control	Hombres (3)	11,67 (± 3,51)	12 (± 5,2)	2,86%	0.87
		Mujeres (19)	11,38 (± 7,9)	11,49 (± 7,5)	0,95%	0.81

Tabla 2: Evaluación del impacto del aceite de coco en la evolución del Alzheimer para determinar si existe influencia en dicha mejora con variables como el sexo.

<i>Valores del deterioro cognitivo según la puntuación del test MEC-LOBO pre y post intervención según DMII o no</i>						
<i>Parámetros</i>	<i>Grupo de estudio</i>	<i>DMII (n)</i>	<i>Inicio de estudio (DE)</i>	<i>Fin de estudio (DE)</i>	<i>Porcentaje de mejoría</i>	<i>P</i>
Promedio	Casos	Sí (4)	13,64 (± 8,78)	16, 18 (± 9,72)	18,65%	0.158
		No (18)	11,16 (±6,57)	16,12 (± 7,39)	44,43%	2.00E-06
	Control	Sí (4)	14,50 (± 8,06)	13,75 (± 7,41)	(-5,17%)	0.571
		No (18)	10,73 (± 7,3)	11,07 (± 7,19)	3,14%	0.467

En este estudio los pacientes que tomaron el aceite de coco mostraron una mejoría del estado cognitivo, sobre todo para las mujeres, las que no tenían diabetes mellitus tipo II y los pacientes graves, este estudio, demuestra la influencia positiva del aceite de coco a nivel cognitivo en los pacientes con Alzheimer, siendo esta mejoría dependiente del sexo, de la existencia o no de diabetes y del grado de demencia (Hu Yang y col., 2015).

Por otro lado, Lim y col. (2013) sugieren que el té verde disminuye el riesgo de sufrir problemas cognitivos, ya que los polifenoles de éste inhiben los problemas cognitivos modulan el estrés oxidativo. Además, se ha demostrado que posee un potente antioxidante, la epigallocatequina-3-galato (EGCG), en modelos animales reduce la generación del péptido β A y las isoformas de tau. Por lo tanto, puede considerarse el consumo de té verde para la prevención de la EA.

Además de estas alternativas se encuentran el resveratrol y la curcumina, los cuales se muestran a continuación.

2.7.1 Resveratrol

Es un polifenol que se encuentra en las uvas, modula diversos sistemas que protegen y propician funciones neuroprotectoras a las células neuronales. Hay estudios que muestran que el principal blanco del resveratrol es el sistema nervioso central, ya que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. A pesar de ello, su biodisponibilidad es baja, ya que se metaboliza con rapidez. En un experimento con ratones a los que se les administró 0.5 μ l/min en el ventrículo izquierdo y después se inyectó β A durante siete días, se demostró al final que el resveratrol había reducido la neurodegeneración a través de la enzima deacetilasa SIRT1. Por lo tanto, el resveratrol activa la SIRT1 y es capaz de proteger ante el estrés oxidativo que los acúmulos de β A ejercen sobre las neuronas. Por lo tanto, promueve la eliminación de los acúmulos intracelulares de β A mediante la activación de la degradación neurotóxica proteosomal. La sobreexpresión de SIRT1 reduce la patogénesis de la EA, ya que evita la síntesis de β A, a partir de la proteína precursora de amiloide APP. Por último, el resveratrol interrumpe los hidrógenos β A y, al adherirse, evita la formación de fibrillas y desestabiliza las ya existentes. La mejor vía de administración de este fitoquímico es por medio de inyección, esto por su biodisponibilidad, ya que el resveratrol regula algunas enzimas, como la SOD y el cloranfenicol (Huang y col., 2011).

2.7.2 Curcumina

Se extrae de la cúrcuma y es un colorante amarillo que tiene una gran afinidad por las fibrillas de β A, por lo que se adhiere en forma de enol. La curcumina inhibe la formación de β A y promueve la degradación de las fibrillas y los ovillos neurofibrilares. Además, la interacción directa con β A es captada por los macrófagos, afectan a la maduración de la APP y las enzimas para su procesamiento. La curcumina es un potente antioxidante que se puede suministrar por vía oral, pero, debido a su poca biodisponibilidad, es mala en soluciones acuosas; por ello, se ha modificado y formulado en altas concentraciones de ciclodextrina, para mejorarla y para que pueda estar disponible en soluciones acuosas. Con el fin de observar la prevalencia de la placa amiloide, se experimentó con ratones, que fueron inyectados en la cola con una solución de 0.1 ml de curcumina y ciclodextrina solubilizadas en suero 4 mM hasta los cuatro meses; se reanudaron las inyecciones a los 10 meses, con 6 mM, y durante las últimas seis semanas los animales fueron inyectados dos veces por semana con 24 mM. Los ratones que fueron inyectados dos veces por semana desarrollaron un 70% menos placas amiloides que el grupo control (figura 1), (A) edad en meses en la cual los ratones transgénicos con Alzheimer recibieron las inyecciones, la dirección de la flecha indica el momento en que los curcuminoideos solubilizados en suero se cambiaron por curcuminoideos solubilizados en 2-hidroxipropil-g-ciclodextrina (HP-g-CD), y el asterisco cuando las inyecciones intravenosas se sustituyeron por inyecciones subcutáneas (B) Sección cerebral teñida con plata de un ratón no transgénico de control sin placas. (C) Sección comparable de un ratón transgénico con Alzheimer a la edad de 12 meses con placas β -amiloideas (puntos grises). (D) El efecto de las inyecciones de curcuminoideos en la carga de placas amiloides (Quitschke y col., 2013).

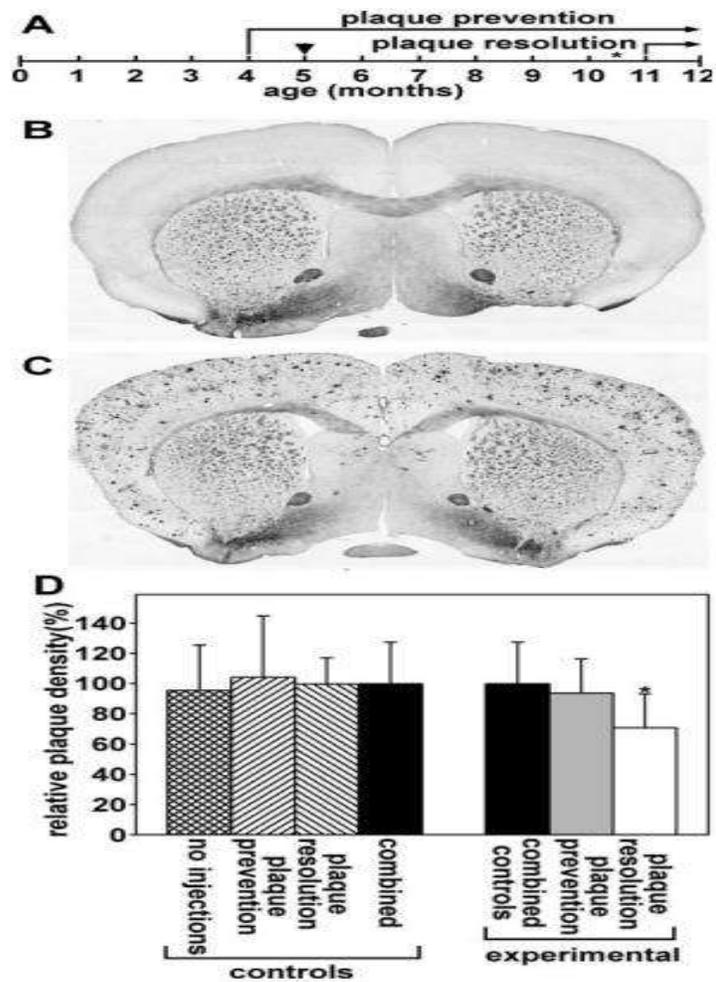


Figura 1: Placas amiloides en cerebros de ratones y el efecto de las inyecciones de curcuminoides. A) escala temporal. B) cerebro de ratones sanos (control). C) cerebro de ratones transgénicos con Alzheimer, edad de 12 meses. D) Efecto de las inyecciones curcuminoides. Panel izquierdo, ratones con Alzheimer no inyectados, panel derecho ratones con Alzheimer inyectados.

En la tabla 3 se muestran una serie de tratamientos alternativos no farmacológicos en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas y la acción que llevan a cabo.

Dieta antioxidante	
Pescado	Contiene ácidos grasos omega-3, EPA y DHA El consumo >2 veces por semana reduce un 60% el riesgo de padecer EA
Frutas y Verduras	Bajo contenido de grasas saturadas Las verduras de hoja verde contienen vitamina E
Fitoquímicos	
Polifenoles	
Arándanos	Elevan el cAMP Mejoran la transmisión sináptica Reducen la toxicidad de β A
Curcumina de la curcuma	Inhibe la formación de β A Promueve la degradación de fibrillas y ovillos neurofibrilares Inhibe la APP
Catequinas del té	Modulan el estrés oxidativo Aumentan la actividad de la enzima SOD Modulan las enzimas α secretasa, β secretasa, y secretasa La EGCG reduce la generación de β A y las isoformas de tau
Resveratrol de la uva	Promueve la eliminación de acúmulos intracelulares de β A Activa la degradación neurotóxica proteosomal Disminuye la formación de placa Protege de la neurotoxicidad inducida por la β A
Cacahuates	Elevan el cAMP Mejoran la transmisión sináptica Reducen la toxicidad de β A
Hormonas	
Melatonina	Protege el sistema colinérgico Tiene un efecto antiinflamatorio Inhibe la generación y formación de fibrillas de β A Inhibe la hiperfosforilación de la proteína tau Tiene gran capacidad para captar radicales libres Inhibe la proteína precursora de β A Activa la proteína cinasa C Inhibe la enzima GSK 3
Estradiol, estrógeno y progesterona	Inhiben la proteólisis de la APP Evitan la formación de β A Mejoran el funcionamiento y la elasticidad neuronal Protegen las neuronas de la apoptosis celular Evitan la acumulación de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares

Tabla 3: Alternativas no farmacológicas en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Herman y col., 2015).

Como hemos visto anteriormente existen distintas alternativas naturales para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas, no obstante, algunas de estas

como lo son el resveratrol y la curcumina presentan ciertos inconvenientes como lo es su baja biodisponibilidad. Es por ello que en la actualidad se siguen buscando alternativas naturales para el tratamiento de estas enfermedades, las cuales sean de fácil acceso y presenten una buena biodisponibilidad.

Una alternativa natural para el tratamiento de las EN es el café, ya que es una bebida de carácter universal que se consume en todos los países del mundo, se ha descubierto que está compuesto por más de mil sustancias químicas entre las cuales destacan: aminoácidos, azúcares, vitaminas y minerales. Además, la composición del café también incluye ácidos clorogénicos con propiedades antioxidantes y la cafeína, una xantina con propiedades estimulantes del sistema nervioso central (Gottleland y de Pablo, 2007), estos compuestos pueden prevenir o retrasar algunos tipos de daños a las células neutralizan los radicales libres causados por el metabolismo de las células y el estrés oxidativo (Mayor-Oxilia 2010).

En un estudio realizado por H. Eskelinen y col. (2009), demostraron que el consumo diario de café disminuyó el riesgo de EA en un 31% de personas de 65 años de edad, durante un seguimiento de 5 años, tabla 4 (H. Eskelinen y col., 2009).

También se ha demostrado que el consumo de café mejoró el rendimiento cognitivo con menos disminución del funcionamiento cognitivo verbal y en menor medida de la memoria visoespacial entre las mujeres, pero no entre los hombres, esto puede deberse principalmente a la cafeína. Además, se ha informado que la cafeína reduce el riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson, una de las enfermedades neurodegenerativas más prevalentes junto con la EA.

Tabla 4: Asociación entre el consumo de café y la demencia.

Cantidad de café	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3
Demencia	O (95% CI)	O (95% CI)	O (95% CI)
0-2 tazas/d	1 (ref.)	1	1
3-5 tazas/d	0.34 (0.16-0.73)	0.35 (0.16-0.75)	0.30 (0.10-0.93)
> 5 tazas/d	0.61 (0.30-1.21)	0.57 (0.28-1.17)	0.83 (0.32-2.15)
<i>Enfermedad Alzheimer</i>			
0-2 tazas/d	1 (ref.)	1	1
3-5 tazas/d	0.38 (0.17-0.89)	0.36 (0.15-0.86)	0.42 (0.12-1.46)
> 5 tazas/d	0.68 (0.31-1.50)	0.61 (0.27-1.37)	1.01 (0.33-3.08)
Demencia (incluidos los diagnósticos de los registros de pacientes para los no participantes en el seguimiento)			
0-2 tazas/d	1 (ref.)	1	
3-5 tazas/d	0.41 (0.24-0.69)	0.40 (0.24-0.69)	
> 5 tazas/d	0.61 (0.37-1.02)	0.57 (0.34-0.96)	

Tabla 4: Modelo 1: se ajustó por edad, sexo, educación, tiempo de seguimiento y comunidad de residencia. **Modelo 2:** se ajustó de acuerdo al consumo de tabaco, la presión arterial sistólica, el colesterol total en suero, el índice de masa corporal y la actividad física. **Modelo 3:** se ajustó adicionalmente por el estado de portador de ApoE ε4, la presencia de infarto de miocardio/ictus/diabetes mellitus en la vida tardía y la escala depresiva de Beck.

Se desconoce cómo el café protege de EA, pero existen varias hipótesis para explicar sus efectos. El consumo de café se ha asociado con una disminución del riesgo de diabetes de tipo 2, y uno de los mecanismos propuestos es que el magnesio, que es abundante en el café, aumentaría la sensibilidad a la insulina. La diabetes, a su vez, aumenta el riesgo de la EA. Una vía podría ser a través de la enzima degradadora de la insulina (EDI), que degrada tanto la insulina como el péptido Aβ. La administración crónica de cafeína ha demostrado tener efectos neuroprotectores en los modelos experimentales de hipoxia e isquemia, también relacionados con la acción de la cafeína como antagonista de los receptores de adenosina (Eskelinen y col., 2009).

El efecto neuroprotector del café también puede deberse a su capacidad antioxidante en la sangre circulante, el polifenol más abundante en el café es el ácido clorogénico

(el éster del ácido cafeico con el ácido quínico) y probablemente sea responsable de una gran parte de los efectos antioxidantes del café (Eskelinen y col., 2009).

2.8 Composición química del café

Entre la composición química del café, destacan los siguientes compuestos químicos (tabla 5; Compuestos químicos) (tabla 6; Número de compuestos químicos identificados): (Gotteland y Saturnino, 2007)

Compuestos químicos	Tipo de café	
	Tostado	Verde
Minerales	4.5	4.2
Compuestos aromáticos	0.1	0
Melanoidinas	0	25.4
Ácidos clorogénico y quínico	3.3	6.9
Ácidos alifáticos	1.6	1.3
Trigonelina o derivados	1	1
Cafeína	1.3	1.2
Lípidos	17	16.2
Aminoácidos	0	0.5
Proteínas	7.5	9.8
Otros azúcares	0	1
Azúcares reductores	0.3	0.1
Sacarosa	0	8
Polisacáridos	38	49.8
% en base seca		

Tabla 5: Composición química de granos de café almendra y tostado de variedades Arábica (Puerta, 2011).

Compuestos químicos identificados	Tipo de café	
	Tostado	Verde
Furanos	139	21
Pirazinas	95	23
Cetonas	85	25
Pirroles	79	3
Fenoles	74	22
Hidrocarburos	61	41
Ácidos y anhídridos	55	27
Aldehídos	37	34
Ésteres	33	34
Alcoholes	33	38
Tiofenos	29	0
Tiazoles	26	0
Oxazoles	25	0
Otros compuestos de S	24	5
Piridinas	23	10
Otros compuestos de N	22	10
Lactonas	8	7
Piranos	2	0

Tabla 6: número de compuestos químicos identificados en el café.

2.8.1 Ácidos clorogénicos

El café contiene una serie de ésteres fenólicos característicos denominados ácidos clorogénicos (AC), el contenido de AC, es del 7% en el café verde y se descomponen parcialmente (30 a 70%) durante el tostado, alcanzan niveles del orden de 4%. Estos compuestos presentan una importante actividad antioxidante. La capacidad antiradical hidroxilo (OH) del café verde y tostado depende del ácido 5-O-cafeoilquínico. Se ha descrito el uso de mezclas de ácido cafeico con ácidos clorogénicos como alternativa al uso de antioxidantes sintéticos. Igualmente se ha demostrado que el café instantáneo puede actuar como prooxidante para el ácido ascórbico y como atrapador de radicales libres superóxido. La actividad antioxidante del café no se debe sólo a los compuestos polifenólicos, sino que también a la presencia de cafeína y compuestos derivados del

tostado. La cafeína tiene la capacidad de inhibir la lipoperoxidación inducida por radicales hidroxilos (OH), peróxidos (ROO) y oxígeno singlete, convirtiéndola en un potente antioxidante con capacidad similar a glutatión y superior al ácido ascórbico. Por otra parte, el proceso de tostado del café induce la formación de compuestos de alto peso molecular como melanoidinas al igual que compuestos de bajo peso molecular que también poseen actividad antioxidante, esto compensaría la disminución de los ácidos clorogénicos que se produce al tostar. La máxima actividad antioxidante se observa en el café medianamente tostado (Gottleland y de Pablo, 2007).

2.8.2 Principal fuente de obtención de la cafeína

El café es el producto que contiene la cantidad más alta y variable de cafeína en la dieta (0.8-1.8%). La dosis de cafeína del café depende de las diferencias genéticas de los granos, así como del tiempo y la forma de preparación (ver tabla 6), oscilan entre 30 y 175 mg por 150 ml. El café descafeinado contiene entre 2 y 8 mg por 150 ml (Pardo y col., 2007).

Tipo de Café	Contenido de cafeína (Promedio)
tostado	83 mg
instantáneo	59 mg
tostado descafeinado	3 mg
instantáneo descafeinado	4 mg
tostado de goteo	84 mg
todos los cafés excepto descafeinado	52.5 mg

Tabla 7: Contenido de cafeína en 150 ml, según el tipo de café (Pardo y col., 2007).

2.8.3 Actividad farmacológica de las xantinas

Estructuralmente, las xantinas son derivados purinérgicos formados por los heterociclos pirimidina e imidazol condensados, dando lugar a las metilxantinas cafeína (1,3,7 trimetilxantina), teofilina (1,3 dimetilxantina) y teobromina (3,7 dimetilxantina) (figura 2). Las sales que forman estos compuestos son fácilmente solubles (Moratallaa, 2008), se relacionan farmacológicamente con los psicoestimulantes (Pardo y col., 2007), en dosis moderadas producen una mejora del rendimiento mental y físico y reducen el cansancio y el sueño. Dosis altas pueden producir ansiedad y disforia, así como trastornos del sueño. Incluso con dosis bajas la cafeína puede actuar como estímulo discriminativo. Fisiológicamente, la cafeína aumenta la presión arterial, la frecuencia respiratoria y la diuresis (Moratallaa, 2008); Sin embargo, como se mencionó anteriormente la cafeína ha demostrado tener efectos neuroprotectores, esto se puede deber a que este alcaloide actúa como estimulante del sistema nervioso central (SNC) producen un incremento en el rendimiento intelectual objetivo y subjetivo, aumentan la capacidad de concentración y de atención. Incrementa la interacción social y produce sensación de bienestar, sin tener consecuencias depresivas una vez pasado el efecto la misma (Moratallaa, 2008).

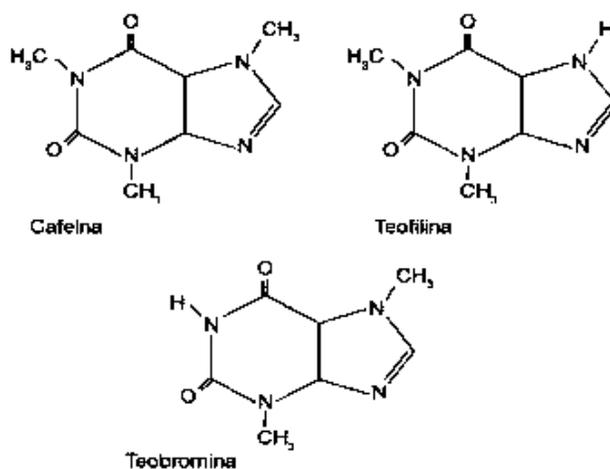


Figura 2: Estructura química de las metilxantinas

2.8.4 El procesamiento del café y su efecto en el perfil químico

El sabor y el aroma del café se desarrollan durante el tueste. Los compuestos volátiles aromáticos se forman gracias a la transformación de los químicos que están presentes naturalmente en los granos de café verde (Perfect Daily Grind, 2019).

La degradación de los polisacáridos y azúcares simples durante el tueste crea aromas dulces y acaramelados. En cambio, la degradación de los ácidos hidroxycinámicos (un tipo de compuestos fenólicos) produce aromas a especias. Los aminoácidos, como la treonina y la serina se transforman en compuestos volátiles llamados pirazinas y pirroles, que crean el aroma característico del café tostado (Perfect Daily Grind, 2019).

2.8.5 Principales métodos de elaboración de café (*Coffea arabica*)

Diversos autores han reportado que la forma de preparar el café cambia sus propiedades, algunos autores han reportado que la mejor forma de preparación son la prensa francesa, y por método de Aeropress, entre otros, ya que proporciona un café con buen sabor, cuerpo y dulzor, no obstante, estos autores solo evalúan el café desde el punto de vista organoléptico (Perfect Daily Grind, 2019), pero no en sus propiedades químicas y protectoras. Otro factor a considerar en la elaboración del café es la temperatura.

La temperatura del agua tiene un impacto directo en el índice de extracción de los diferentes componentes químicos de una preparación de café. Durante la preparación, el agua extrae ácidos clorogénicos, acéticos y málicos; cafeína, aceites, entre otros compuestos. Estas reacciones también tendrán lugar en diferentes momentos: la cafeína, por ejemplo, se extrae en los inicios de la preparación, así como los ácidos afrutados, luego sigue la dulzura, y al final se extrae el amargor (Perfect Daily Grind, 2018).

Por lo anterior nos hemos interesado en evaluar la preparación y el tipo de tostado de la semilla de café en el modelo biológico *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), el cual ha demostrado ser un potente modelo de estudio, es por ello que este trabajo utilizamos al nematodo *C.elegans* como modelo biológico de estudio, para evaluar qué tipo de tostado y preparación de café brinda un mejor efecto protector ante el estrés oxidativo, como un primer acercamiento al proceso de neuroprotección en cepas mutantes de *C. elegans*.

2.9 *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

C. elegans es un nematodo de vida libre no parasitario, el cual ha demostrado ser un modelo de estudio adecuado, ya que desde su introducción se ha utilizado ampliamente para investigar importantes procesos biológicos como: el desarrollo, envejecimiento, neurobiología y diversas patologías crónicas degenerativas (Markaki y Tavernarakis, 2010). Además, presenta una serie de ventajas como: ciclo de vida corto (± 25 días a 20°C) (figura 3), lo que permite obtener resultados en un periodo de tiempo menor que con otros organismos (por ejemplo en ratones) Los recursos genéticos en esta especie son asombrosos: se dispone de un genoma secuenciado en su totalidad que comparte una homología de casi un 70% con el humano. Esto supone un elevado valor añadido al uso de esta especie como modelo, por ejemplo, para el estudio de muchas enfermedades humanas difíciles de investigar: el 40% de los genes relacionados con enfermedades humanas se encuentran presentes en el nematodo. Otra característica que facilita los estudios biológicos en el nematodo es el reducido número de células que lo conforman: 959 células somáticas forman órganos y sistemas simples (1031 en el caso de los machos, X0) que unido a la transparencia del gusano facilita los estudios del desarrollo. De entre estas células, 302 (381 en los machos) son neuronas que conforman un sistema nervioso primitivo que permite realizar también estudios de comportamiento. *C. elegans* tiene respuesta sensitiva al tacto, al sabor, olor y a la temperatura, además de otros comportamientos complejos: apareamiento, comportamiento social, aprendizaje y memoria. En este sentido, están siendo utilizados como modelo para estudios de patologías de la conducta humana o enfermedades de

neurodegeneración como la enfermedad del Alzheimer, Parkinson y Huntington por mencionar algunas (Markaki y Tavernarakis, 2010).

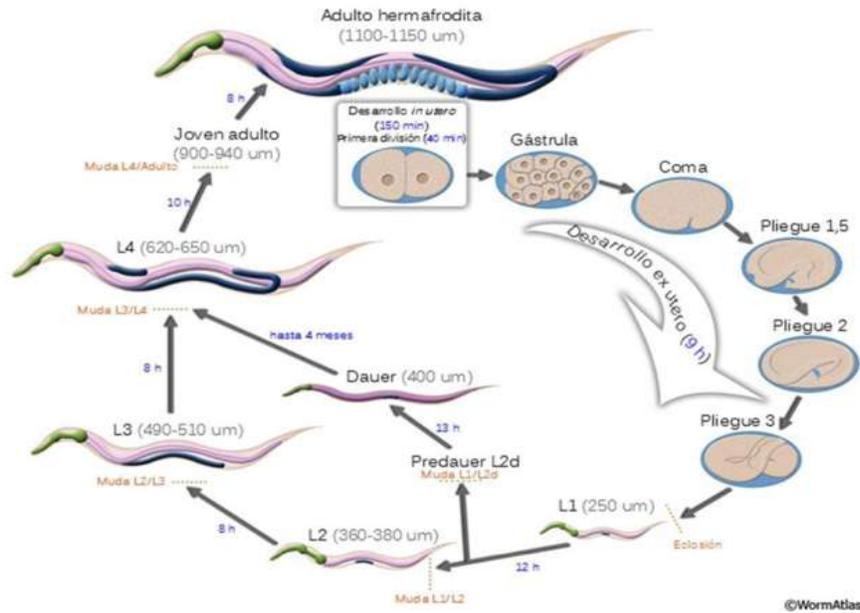


Figura 3: ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*.

2.9.1 Estrategias de defensa frente al estrés oxidativo en *C. elegans*

Como se ha mencionado, las especies reactivas del oxígeno están implicadas en el daño celular. Sin embargo, existen dos grupos principales de antioxidantes para contrarrestar las ROS, se reconocen, a saber, los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos incluyen enzimas de fase 2, como la glutatión S-transferasa (GST) y uridina 50-difosfo-glucuronil transferasa (UGT) (Becker y col., 2004; Ratman y col., 2006; Dinkova y col., 2008; Lassen y col., 2008). Los antioxidantes no enzimáticos se pueden dividir en dos categorías: los antioxidantes exógenos y los endógenos. Los antioxidantes exógenos son solubles en agua (por ejemplo, ácido ascórbico [vitamina C] y compuestos polifenólicos) o solubles en lípidos (por ejemplo, tocoferoles [vitamina E] y carotenoides), productos naturales que están abundantemente presentes en hierbas, especias, frutas y vegetales (Ndhlala y col.,

2010; Crozier y col., 2010; Smirnorff y col., 2010), mientras que los antioxidantes endógenos se producen en nuestro cuerpo y consisten en, por ejemplo, glutatión, coenzima Q (ubiquinol), ácido α -lipoico, ácido úrico, ferritina y tioredoxina (Dinkova y col., 2008; Meister y col., 1988).

Al igual que los mamíferos, el nematodo *C. elegans* tiene sistemas de defensa contra el estrés bien definidos para la protección de compuestos tóxicos (Van Raamsdonk y Hekimi, 2010). Estas vías de señalización, y sus modos de regulación, se encuentran de manera conservada, a lo largo de la evolución, al igual que con sus homólogos de mamíferos (Tissenbaum, 2015). Por lo tanto, *C. elegans* ofrece un modelo adecuado para analizar la red reguladora de genes involucrada en la expresión de genes de respuesta al estrés. En los últimos años, se ha prestado mayor atención a los factores de transcripción altamente conservados DAF-16 / FOXO y SKN-1 / Nrf2 debido a sus papeles asociados en respuesta al estrés oxidativo y la extensión de la vida útil en *C. elegans* (Kenyon y col., 1993; Murphy y col., 2003; An y Blackwell 2003; Blackwell y col., 2015). Estos factores regulan la transcripción de genes de desintoxicación esenciales como *sod-3* y *gst-4*, los cuales codifican para la proteína antioxidantes, superóxido dismutasa, extracelular y para la enzima glutatión transferasa y por lo tanto promueven resistencia al estrés oxidativo (Oliveira y col., 2009, Wang y col., 2010; Shore y Ruvkun, 2013).

III. Moléculas de bajo peso molecular

3.1 Sistema glutatión

El glutatión es un importante antioxidante tripéptido no proteínico constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina, y su concentración intracelular es un indicador de estrés oxidativo. Dentro de las células, el glutatión existe en dos formas diferentes: la forma de sulfhidrilo reducido (GSH) y el disulfuro de glutatión (GSSG), forma oxidada. Las especies reactivas de oxígeno son neutralizadas por GSH a través de una cascada concertada de desintoxicación, estos mecanismos involucran glutatión peroxidasas (GPx), glutatión S-transferasas (GST) y glutatión reductasa (GR) (Halliwell, 1996; Rossi y col., 2002).

El glutati3n es fundamental en procesos de destoxificaci3n celular y la relaci3n entre glutati3n reducido/oxidado (GSH/GSSG) contribuye al estatus redox de la c3lula.

3.1.1 Glutati3n peroxidasa (Gpx)

Se encuentra localizada en el citosol y la mitocondria. Su importancia reside en que es considerada como el principal sistema antioxidante en niveles bajos de estr3s oxidativo (Benner y col., 2011). El t3rmino glutati3n peroxidasa (GPx) se asocia a una familia de m3ltiples isoenzimas (GPx1–8) que cataliza la reducci3n de H₂O₂ a agua utilizan glutati3n como donador de electrones (Margis y col., 2008; Sena y Chandel, 2012). En *C. elegans*, de la misma forma que en humanos, existen diversos genes que codifican para GPx (*gpx 1-8*) (Sakamoto y col., 2014).

3.1.2 Prote3nas y enzimas antioxidantes

Est3 claro que un exceso de ROS contribuye a producir da3os a diferentes niveles, por lo que el organismo cuenta con mecanismos de defensa antioxidante end3genos, principalmente prote3nas y enzimas, para eliminar el exceso de ROS producidas (3Dura3kov3, 2014).

3.1.3 Super3xido dismutasa (SOD)

La cadena transportadora de electrones favorece la producci3n principalmente de radical super3xido. La SOD cataliza la dismutaci3n del radical super3xido a H₂O₂ que posteriormente puede ser transformado a agua por la acci3n de otras enzimas como catalasa (CAT), glutati3n peroxidasa (GPx) y/o peroxirredoxinas (Prxs) (Fridovich, 1995). En *C. elegans*, cinco genes codifican a la Super3xido dismutasa: *sod-1* a *sod-5*. SOD-1, SOD-4 y SOD-5 son SOD las cuales realizan uni3n al i3n Cobre y Zinc (Cu / Zn), mientras que SOD-2 y SOD-3 son SOD que realizan actividad de uni3n al i3n de Manganeso (Mn) (Jensen y Culotta, 2005; Yang y col., 2007; Doonan y col., 2008). SOD-1 en s3 mismo contribuye con casi el 80% de la expresi3n total de ARNm de *sod*, as3 como con el 80% de la actividad total de SOD en *C. elegans* (Doonan y col., 2008). El hecho de que el control de los niveles de super3xido y per3xido se distribuye en cinco SODs diferentes con diferentes propiedades, distribuciones subcelulares y

posiblemente distribuciones tisulares hace que *C. elegans* sea un modelo particularmente bueno para explorar la variedad de roles biológicos de las SODs.

3.1.4 Catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno se forma por la dismutación del radical superóxido y también en la reacción de algunas oxidasas. La catalasa cataliza la dismutación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno. La mayoría de estas enzimas son homotetrámeros con un grupo hemo en cada subunidad. El genoma de *C. elegans* contiene una disposición en tándem de tres genes que codifican para la catalasa (*ctl-1*, *ctl-2*, y *ctl-3*). CTL-2 es una catalasa peroxisomal, y es responsable de ~80% de la actividad total de la catalasa. También tiene un pH óptimo más bajo para la actividad y mayor actividad peroxidasa que las catalasas peroxisomales de mamífero. Gran parte de las secuencias de genes *ctl-1* y *ctl-3* son 100% idénticos.

3.2 Factores de transcripción implicados en estrés oxidante

Ruta de la insulina y factor IGF-1. Se ha demostrado que la vía de señalización de insulina / IGF-1 regula la vida útil de muchos organismos (Barbieri y col., 2003; Katic y Kahn, 2005; Kenyon, 2005). En *C. elegans*, en esta vía de señalización, los péptidos similares a la insulina se unen a su receptor (DAF-2/IGF-1), reclutan un sustrato receptor de insulina. Esto activa el fosfatidil inositol-3-OH quinasa AGE-1 / PI3K, aumentan el nivel de fosfatidil inositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), que a su vez activa una cascada de quinasa, formada por 3-fosfoinositido dependiente de la proteína quinasa 1 (PDK-1), proteína quinasa B (AKT-1 / -2) y quinasa-1 inducible por suero y glucocorticoides (SGK-1). Esta cascada inactiva por fosforilación el factor de transcripción DAF-16 / FOXO, lo que resulta en la translocación de DAF-16 / FOXO desde el núcleo al citosol. La proteína quinasa activada por AMP (AMPK / AAK-2) también es capaz de fosforilar DAF-16 / FOXO (Altintas y col., 2016) (figura 4). En condiciones normales, la reducción de la actividad de esta vía, por ejemplo, mediante la mutación del gen del receptor de insulina / IGF-1 (*daf-2*, en *C. elegans*) (Kimura y col.,

1997), disminuye el proceso de envejecimiento y duplica la esperanza de vida (Kenyon y col., 1993). Este período de vida prolongado requiere la actividad del factor de transcripción FOXO/ DAF-16 y el factor de transcripción de choque térmico HSF-1 (Henderson y Johnson, 2001; Hsu y col., 2003; Ogg y col., 1997). Además, DAF-16 y HSF-1 contribuyen a la longevidad de los nematodos WT cultivados con bacterias en condiciones estándar de laboratorio, ya que al reducir la actividad de los genes *daf-16* o *hsf-1* acelera la tasa de envejecimiento del tejido y acorta la vida útil (Garigan y col., 2002; Herndon y col., 2002; Kenyon y col., 1993; Lin y col., 2001) Adachi y col., 1998 demostraron que los nematodos con una mutación en el gen *age-1* tenían una menor concentración de proteínas carboniladas y que los niveles de éstas no aumentaban con la edad, en comparación con lo que ocurría en la cepa silvestre. Los mutantes *age-1* no sólo eran resistentes a estrés oxidante inducido químicamente, sino también a otras formas de estrés, como estrés térmico (Manzanero-Rodríguez y col., 2018), radiación UV (Murakami y Johnson, 1996) y exposición a metales pesados (Baryte y col., 2001), lo que también contribuiría a una mayor longevidad.

Si bien, no hay estudios que demuestren la participación de los compuestos fenólicos del extracto de *Coffea arabica* en esta vía de señalización, las investigaciones solamente se han enfocado en estudiar compuestos de manera individual, como los flavonoides, actúan como antioxidantes indirectos.

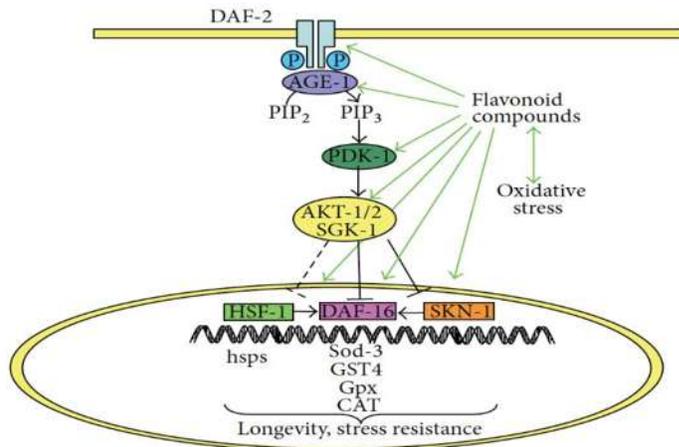


Figura 4: Vía de señalización de la insulina en *C. elegans*. Esquema simplificado de la IIS-IGF-1. (Koch y col., 2014).

IV. Justificación

En la actualidad no hay cura para las enfermedades neurodegenerativas, solo existen medicamentos que pueden ayudar a controlar o retrasar la progresión de estas durante algún tiempo, no obstante, estos medicamentos además de ser costosos generan efectos secundarios adversos, afectan la calidad de vida de los pacientes con estas condiciones. Se ha demostrado que el café contiene una gran cantidad de sustancias bioactivas como los ácidos clorogénicos y las xantinas, por mencionar algunos, los cuales ejercen actividad antioxidante inhiben o retardan el proceso de oxidación de las biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN. Para esto se evaluarán dos formas distintas de preparación del café en sus diferentes tipos de tostado para ver cómo afecta en su perfil químico. Por lo cual se busca contribuir a la prevención de las EN, generando información científica que apoye el uso de infusiones de café con fines terapéuticos, ya que es un alimento natural, su producción es a gran escala y se consume en todos los países del mundo.

V. Hipótesis

El tostado y la preparación de *Coffea arabica* modifica su capacidad para proteger del estrés oxidativo a *C. elegans*

VI. Objetivos

6.1 Objetivo general

Determinar el efecto protector ante el estrés oxidativo de *Coffea arabica* en función del tipo de tostado y preparación en el modelo *C. elegans*

6.1.2 Objetivos particulares

- 1.- Determinar el contenido de fenoles totales y cafeína en las diferentes infusiones de *Coffea arabica*
- 2.- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de diferentes infusiones de *Coffea arabica*
- 3.- Determinar el efecto de las infusiones de *Coffea arabica* en la resistencia de estrés oxidante en *C. elegans*

VII. Materiales y Métodos

7.1 Material biológico

Coffea arabica

Se utilizaron granos de café de distinto tipo de tostado, entre los cuales se encuentran: café verde, Veracruz tueste claro®, Chiapas tueste oscuro®, descafeinado tueste medio® los cuales se adquirieron en la tienda llamada café europa en Morelia Michoacán y se comparó su efecto contra un café soluble industrial, nescafé® y café nescafé descafeinado®.

7.1.2 Cepas de *Caenorhabditis elegans* y condiciones de cultivo

Las cepas de *Caenorhabditis elegans* fueron adquiridas en el Centro de Genética *Caenorhabditis* (CGC) de la Universidad de Minnesota, St. Paul.

- Silvestre Bristol (N2) (cepa control)
- CF1038 *daf-16* (*mu86*)
- GR1339 *daf-2* (*e1370*)

Los nematodos se cultivaron en placas NGM sembradas con *Escherichia coli* OP50, incubándolas a 18°C. Los nematodos se sincronizarán con una solución de hipoclorito de sodio (modificado de Shapira y col., 2008), una condición en la que solo los huevos pueden sobrevivir, los cuales se lavaron con solución buffer M9 a una concentración de 1M. Después de la sincronización, los nematodos se sembraron en una placa NGM (condición control) y en placas suplementadas con las infusiones del café y se alimentaron con *E. coli* OP50 hasta que alcanzaron la etapa larvaria L4.

7.1.3 Preparación de las infusiones de las muestras

Para la extracción de los compuestos del café se pesaron 3 gramos de cada tipo de café. Para la preparación 1 se utilizó el método convencional por infusión, se pesaron 3 g de café y se adicionaron 30 mL de agua a una temperatura de 92 °C y se dejaron en extracción durante 30 minutos, posteriormente se filtraron con un papel filtro whatman; para la preparación 2 se utilizó una cafetera a vapor en donde se agregaron 3 g de café. El extracto recuperado fue almacenado a 4°C en viales color ámbar hasta su uso.

7.2 Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Wan y col., 2011) para placa de 96 pozos. Se incubaron durante 4 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, posteriormente se tomaron 2 μL de la muestra y 50 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 0.2 N, posteriormente se añadieron 40 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3 , 7.5 %) y agua destilada hasta tener un volumen final de 250 μL en cada pozo de la placa. Se incubaron durante 90 minutos en oscuridad y se leyeron en un lector de microplacas UV-Vis (EPOCH, BioTek, EE. UU) a 760 nm. El contenido de fenoles totales se calculó mediante una curva estándar de ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico).

7.3 Determinación de cafeína por HPLC

La cuantificación de cafeína se determinó por cromatografía de líquidos (HPLC). Para la preparación de la muestra (infusión), stock 1: se pesaron 0.025 g de cafeína, se disolvió en agua y se aforo a 25 mL con agua destilada, el stock 1, quedo en 1 mg/mL; stock 2: se diluyo 1 mL de la solución stock 1 con 9 mL de H_2O destilada, se tomó 1 mL, del stock 1, se aforo a 10 mL. El stock 2 quedo a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cafeína. Condiciones de cromatografía, columna C18 150x4.6mm, temperatura de la columna: 30°C, flujo 0.8 mL/min, absorbancia 272-275nm, inyección 20 μL , tiempo de corrida 25 min, fase móvil 0.1% ácido fosfórico/ acetonitrilo (80/20) elución isocrática (Virgen-Ortiz., 2020).

7.4 Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro*

Las muestras se normalizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fenoles totales para cada una de las pruebas. La actividad antioxidante se expresó en μM de equivalentes de TROLOX/mL (μM de TROLOX/mL). Se adaptaron los métodos para microplacas de 96 pozos, y la actividad antioxidante se calculó mediante una curva estándar de Trolox.

7.4.1 Método DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó un método colorimétrico que se basa en la reducción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), cambia su color de

púrpura a amarillo en presencia de antioxidantes, y se usa ampliamente como un estudio preliminar (Moon y Shibamoto, 2009).

El DPPH 10 mM se disolvió en metanol 80 % hasta una concentración final de 0.1 mM. Después, se añadió 10 μ L de la muestra normalizada y se adicionaron 140 μ L del radical DPPH $^{\cdot}$, se incubo durante 2 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente, y se leyeron en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH, BioTek, EE. UU) a 517 nm, de acuerdo a Brand y col. (1995).

7.4.2 Método ABTS $^+$

Este método es un ensayo colorimétrico en el que el radical ABTS $^+$ (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) se decolora en presencia de antioxidantes (Moon y Shibamoto, 2009). Inicialmente, se realizó una dilución del radical catiónico ABTS $^+$ 14 mM (Roche) con persulfato de potasio 2.6 mM, en partes iguales y se llevó a agitación durante 90 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 739 nm y se ajustó con metanol hasta una absorbancia final de 0.8. Posteriormente, se añadió el extracto normalizado y la solución preparada previamente en una microplaca, se incubo durante 1 minuto a temperatura ambiente en oscuridad y se leyó la absorbancia a 739 nm en un lector de microplacas (EPOCH, BioTek, EE. UU), de acuerdo a Re y col. (1999).

7.4.3 Método FRAP

Este es un ensayo colorimétrico que mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo azul intenso del complejo Fe (III)- Tripiridiltriazina férrica a su forma ferrosa, cambia así su absorbancia, se realizó de acuerdo a Benzie y Strain (1996). Se preparó una solución de acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) 300 mM, Cloruro de hierro ($FeCl_3$) 20 mM, y 2,4,6-Tri(2-pyridil)-s-triazina (TPTZ) (Sigma) 10 mM en una proporción de 10:1:1, se calentó a 37°C en oscuridad durante 10 minutos. Después, se añadió en cada pozo de la placa 10 μ L de muestra normalizada y 190 μ L de la solución preparada anteriormente, se incubo durante 20 minutos en oscuridad y la absorbancia se midió a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro UV-Vis para microplacas (EPOCH, BioTek, EE. UU).

7.5 Sincronización de *C. elegans*

La sincronización de *Caenorhabditis elegans* es necesaria para eliminar la variación en los resultados debido a las diferencias de edad y se realizó de acuerdo con Shapira y col. (2008) con ligeras modificaciones. Los nematodos se crecieron aproximadamente 5 días a 25°C, para tener una población adulta con alta cantidad de huevos. Después se lavaron tres veces con buffer M9 y se añadió una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 10 N, se agitó rigurosamente durante 4 minutos y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto y se lavaron tres veces con buffer M9, donde posteriormente se agregó Fluorodeoxiuridina (FUdR) a una concentración de 0.6 mM para inhibir su reproducción. Finalmente, se dejaron incubar los huevos durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación, una vez eclosionados, se pasaron a placas nuevas de NGM con alimento.

7.6 Ensayos de resistencia a estrés oxidante en *C. elegans* con peróxido de hidrógeno

Para la inducción de estrés oxidante químicamente con peróxido de hidrógeno, se colocaron 20 nematodos, cuando alcanzaron la etapa adulta, en medio M9 suplementado con 0 (control) y 100 µg/mL de fenoles totales (concentración máxima de fenoles que no resultó tóxica para el nematodo). Posteriormente, se incubó a 18 °C durante 48 horas en oscuridad, transcurrido ese tiempo, se realizaron lavados con M9 y se agregaron concentraciones de 5 a 15 mM de H₂O₂. El porcentaje de sobrevivencia se evaluó cada hora por un tiempo total de 6 horas. Los nematodos que no se movieron después de estímulos repetidos se consideraron muertos. Se calculó la CL₅₀ del H₂O₂ en las diferentes infusiones de café.

7.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba de Tukey. Todos los cálculos se realizaron en el programa Microsoft Office Excel 2019 versión 16.2. Los experimentos se realizaron por triplicado y los ensayos de esperanza de vida por sextuplicado. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos experimentales se mostraron como el promedio ± s.d. de al

menos tres experimentos independientes. Los análisis se realizaron en el software GraphPad Prism 7.0.

VIII. Resultados

8.1 Contenido de compuestos fenólicos en las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación

Se determinó el contenido de fenoles totales de las infusiones de los diferentes tipos de tostado de café en sus dos distintas preparaciones, para determinar las diferencias entre estos factores. Los resultados mostraron que el café oscuro gourmet, en su preparación por cafetera presento la mayor cantidad de compuestos fenólicos, con un valor de 40.42 mg de equivalentes de ácido gálico/g (EAG/g), mientras que el menor contenido correspondió al café claro gourmet en la misma preparación 18 mg EAG/g. El café verde, que solo pudo ser preparado por infusión, mostró un contenido de fenoles totales de 24 mg EAG/g. Con respecto a la forma de preparación, en el caso del café oscuro y descafeinado gourmet, no se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre las dos preparaciones, mientras que para el café tostado claro si se observó diferencia significativa, siendo un 94% mayor en la infusión con respecto a la preparación por cafetera (Figura 5).

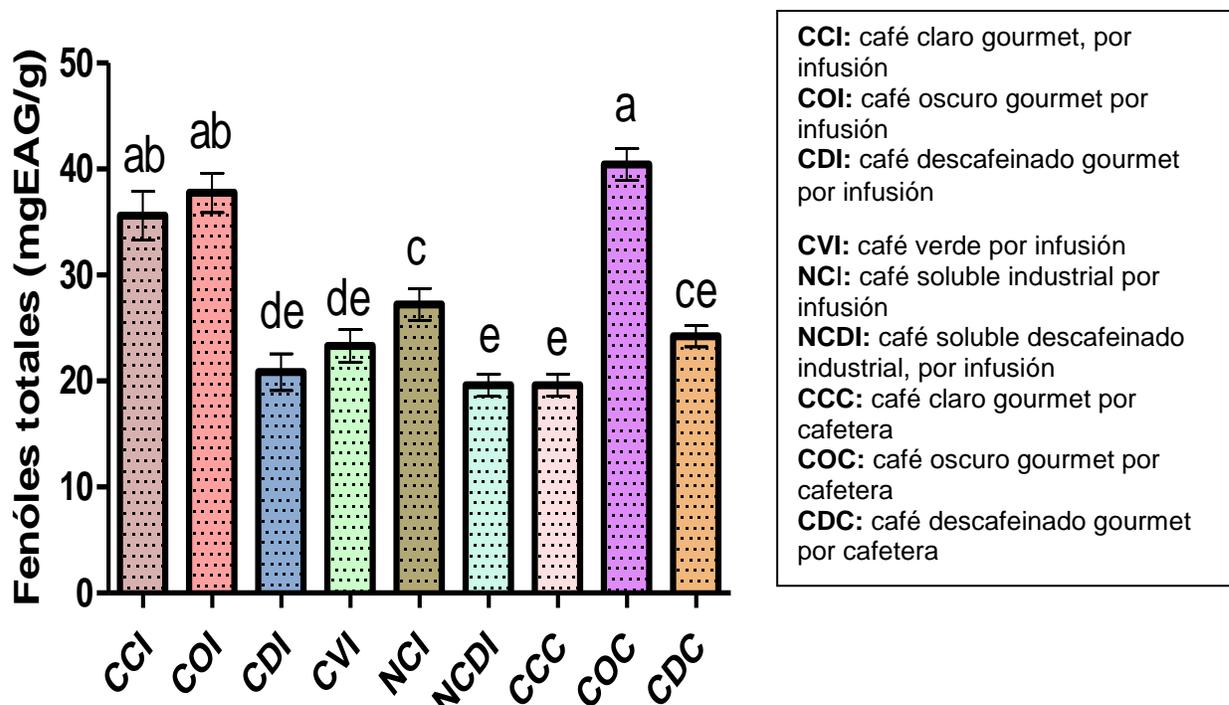


Figura 5: Contenido de compuestos fenólicos en las infusiones de café gourmet e industrial por los distintos tipos de preparación; ANOVA, Tukey; $\alpha=0.05$ letras diferentes

denotan diferencia significativa; las barras de error representan la desviación estándar (SD), n=6.

8.2 Contenido de cafeína en las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación

Se determinó el contenido de cafeína por cromatografía líquida (HPLC), en donde encontramos valores muy distintos entre los distintos tipos de café (figura 6), con variaciones de hasta 29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ entre el café industrial con cafeína y el café claro por infusión; como se puede observar el café oscuro gourmet en su preparación por infusión mostro un contenido de 88.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cafeína, mientras que en su preparación por cafetera mostro una menor extracción de este compuesto con 45.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cafeína lo cual nos indica que para obtener en mayor cantidad este compuesto es ideal utilizar una preparación por infusión, respecto con los cafés descafeinados el que mostro un menor contenido de este compuesto fue el café industrial.

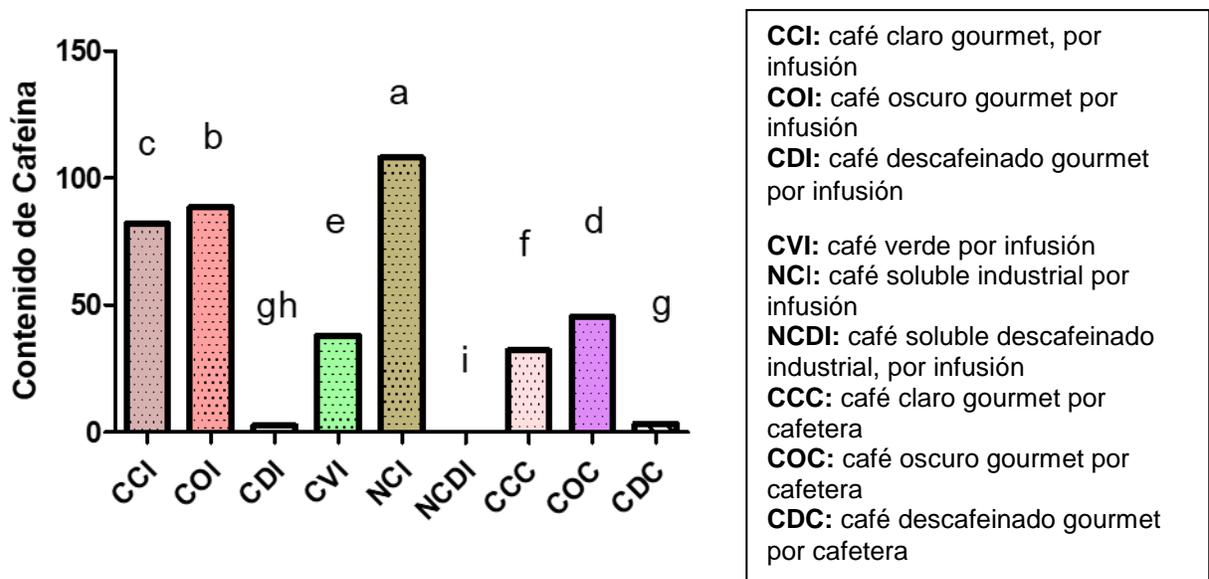
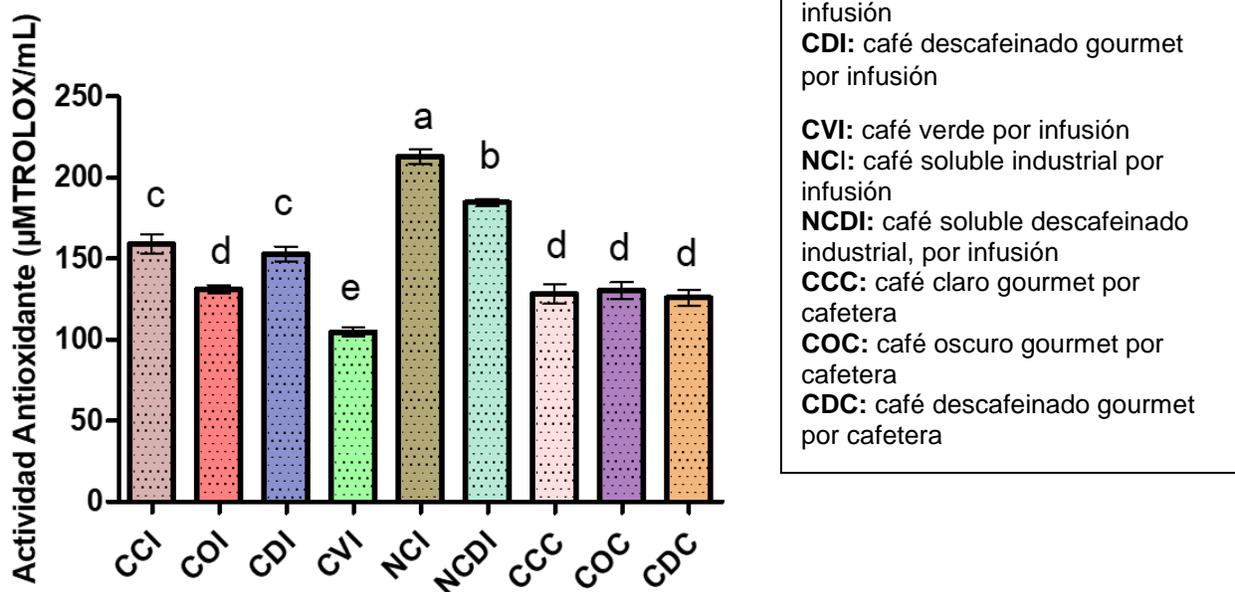


Figura 6: Contenido de cafeína en las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación. ANOVA, Tukey; $\alpha=0.05$ letras diferentes denotan diferencia significativa; las barras de error representan la desviación estándar (SD), n=3.

8.3 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación, mediante la prueba de DPPH⁻

La capacidad de eliminación del radical DPPH⁻ por las infusiones de café gourmet e industrial se presentan en la figura 8, en donde la concentración de fenoles totales fue normalizada a 10 µg/mL, para poder evidenciar las diferencias en la capacidad antioxidantes de las preparaciones. El café soluble industrial por infusión mostró la mayor capacidad para la eliminación de este radical con 210 µM TROLOX/mL, en comparación con el café verde, el cual presentó el menor valor (110 µM TROLOX/mL). Las preparaciones realizadas por método de cafetera no muestran diferencia significativa entre ellas, no obstante, tienen algunas variaciones en comparación con las preparaciones realizadas por infusión, lo cual nos indica que si influye el tipo de preparación de la bebida de café en la actividad antioxidante.

Figura 7: Actividad antioxidante *in vitro*, de las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación ANOVA, Tukey; $\alpha=0.05$ letras diferentes denotan diferencia



significativa; las barras de error representan la desviación estándar (SD), n=6.

8.4 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación, mediante la prueba de ABTS ⁺

La capacidad de eliminación del radical libre ABTS ⁺ por las infusiones de café gourmet e industrial se presentan en la figura 9, en donde se obtuvieron valores con diferencia significativa, siendo el café soluble descafeinado industrial, por infusión el que presenta una mejor capacidad de eliminación de este radical con 160.24 μ M TROLOX/mL, mientras que el café claro preparado en cafetera presento la menor capacidad antioxidante en este ensayo con 30 μ M TROLOX/mL. Como se puede observar en la figura, a diferencia de la prueba de DPPH[•], en este caso se observaron diferencias entre la capacidad antioxidante de las preparaciones por infusión y por cafetera, presentan una mejor eliminación de este radical por las preparaciones por infusión, a excepción de NCDI. Como se puede observar CCI, presento valores de 20.90 μ M TROLOX/mL, con el segundo mejor en la eliminación de este radical.

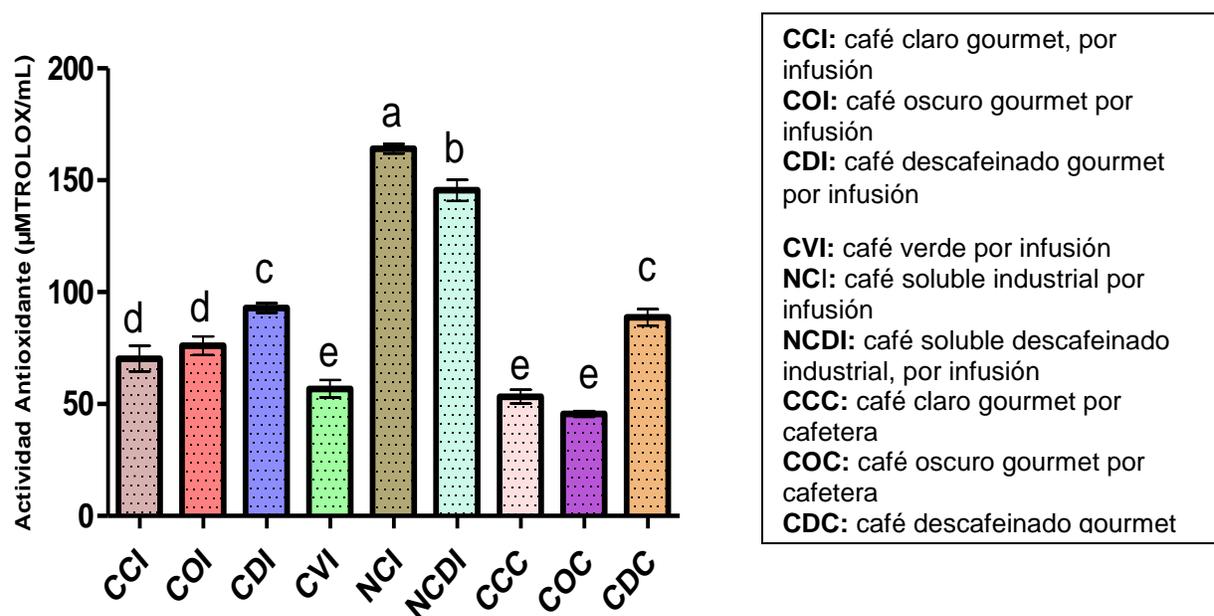


Figura 8: Actividad antioxidante *in vitro*, de las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación, ANOVA, Tukey; $\alpha=0.05$ letras diferentes denotan diferencia significativa; las barras de error representan la desviación estándar (SD), n=6.

8.5 Determinación de actividad antioxidante *in vitro* de las infusiones de café gourmet e industrial por los dos distintos tipos de preparación, mediante la prueba de FRAP

Para el ensayo de FRAP, el café industrial con y sin cafeína obtuvieron una mayor capacidad para reducir el hierro férrico a su forma ferrosa, en comparación con el café gourmet claro y oscuro por infusión, NCI y NCDI presentaron valores de 164 y 145.5 $\mu\text{MTrolox/mL}$, respectivamente. Más del doble de actividad que el café gourmet claro y oscuro por infusión, los cuales presentaron valores de 70 y 76 $\mu\text{MTrolox/mL}$ respectivamente. Como se puede observar en la figura 10 en los cafés gourmets, la forma de preparación sigue influyendo en la actividad antioxidante que brindan.

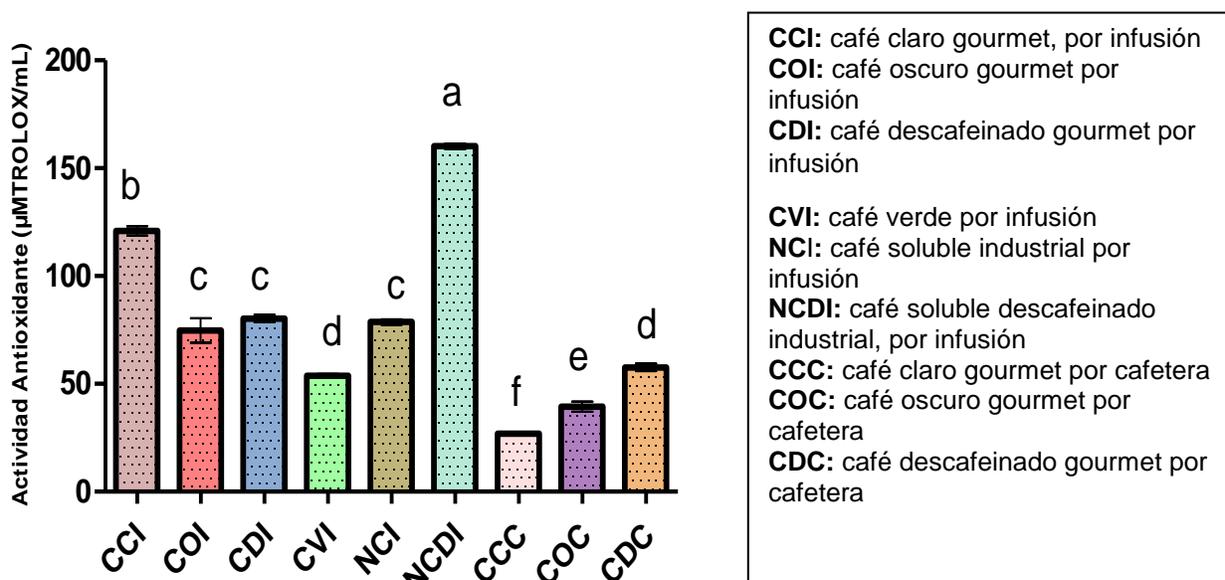


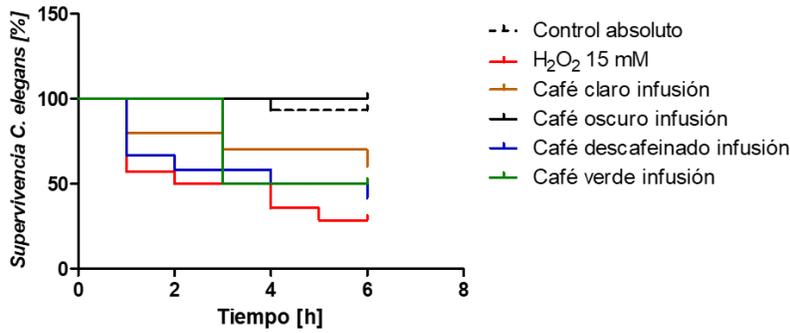
Figura 9: Actividad antioxidante *in vitro*, de ANOVA, Tukey; $\alpha=0.05$ letras diferentes denotan diferencia significativa; las barras de error representan la desviación estándar (SD), $n=6$.

8.6 Efecto de los compuestos químicos del café gourmet e industrial, frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en *C. elegans* N2

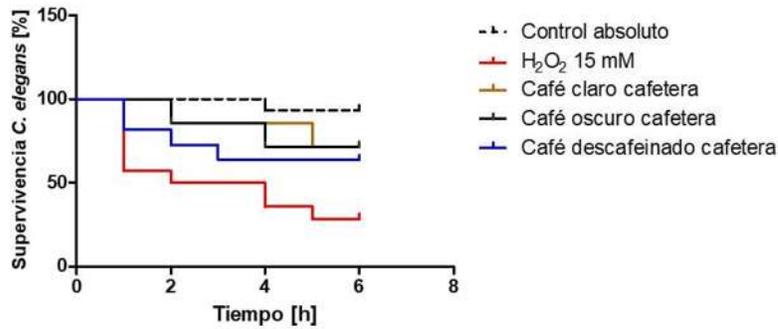
Se indujo el estrés oxidante en *C. elegans* N2 por inducción química con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para poder determinar si los compuestos químicos del café ofrecen protección ante el estrés oxidativo inducido, en donde se encontraron los siguientes resultados. El café preparado por infusión se encuentra en la figura 10 (A); en el cual se observa que en el control los nematodos tuvieron una supervivencia del 97%; en los nematodos expuestos al H_2O_2 se observó un decaimiento del 40% de la supervivencia desde la primera hora del ensayo, la cual continuó descenso, manteniendo solo al 28% de su población viva hasta la hora 6 del ensayo. El café oscuro resulto ser el mejor ante el estrés oxidativo, para esta cepa, debido a que mantuvo al 100% de su población viva, como se puede observar en la figura 5 y 6 este tipo de tostado y preparación fueron el segundo mejor en cuanto al contenido de fenoles totales y el contenido de cafeína respectivamente, lo cual puede estar actuando de manera sinérgica y favorable ante el estrés oxidativo. Por otro lado, el proceso de tueste del café también influye en el perfil químico, debido a que se observó que el café verde por infusión solo mantuvo al 41% de su población viva.

El café preparado con cafetera de vapor se presenta en la figura 10 (B); cómo podemos observar, el control absoluto mantuvo al 95% de su población viva, el control con H_2O_2 mantuvo sólo al 30% de la población viva hasta la hora 6 del ensayo, como se puede observar el café claro y el café oscuro mantuvieron al 70% de su población viva, mientras que el café descafeinado mantuvo solo al 63%, frente al estrés oxidativo, como podemos observar en la figura 10 (A), el proceso de preparación si influye en el perfil químico de manera favorable para la salud. El café industrial se muestra en la figura 10 (C), el control absoluto mantuvo al 96% de su población viva durante las 6 horas del ensayo, para el control con peróxido se mantuvo solo al 30% de la población, mientras que para el café industrial con cafeína mantuvo al 64% de la población viva y el café industrial sin cafeína mantuvo solo al 24% de la población, lo cual nos lleva a deducir que la cafeína en sinergia con los fenoles totales si ejercen un efecto favorable antioxidante ante el estrés oxidativo

(A)



(B)



(C)

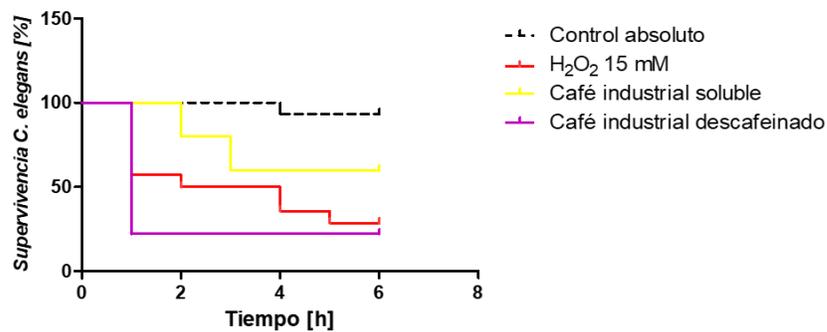


Figura 10: Efecto del café en la protección al estrés oxidativo en *C. elegans* N2. (A) Preparación por infusión; (B) Preparación en cafetera de vapor; (C) Cafés industriales por infusión. n=6.

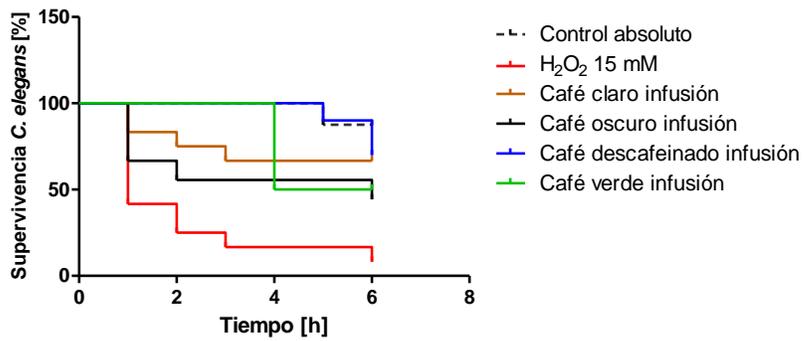
8.7 Efecto de los compuestos químicos del café gourmet e industrial, frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en la cepa GR1339 *daf-2*

Para determinar el posible mecanismo de protección de las preparaciones de café, se indujo el estrés oxidante en *C. elegans* GR1339, cepa mutante en el gen *daf-2*, que codifica a un receptor insulínico en *C.elegans*. Este gen es el encargado de regular el desarrollo reproductivo, el envejecimiento, estrés oxidativo entre otros. Los resultados mostraron lo siguiente, en la figura 11 (A) se muestra el café por una preparación por infusión. En el control absoluto obtuvimos viva al 90% de la población, mientras que en control con H₂O₂ se mantuvo viva sólo al 17% de la población a la hora 6 del ensayo. En el café descafeinado obtuvimos al 91% de la población viva, igualándose con el control absoluto, posteriormente tenemos al café claro con un 67% y al café oscuro con un 57% de su población viva respectivamente.

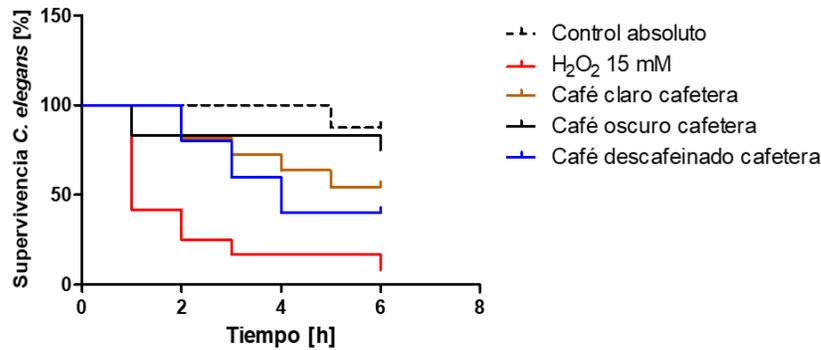
El café por una preparación por cafetera se muestra en la figura 11 (B), en donde obtuvimos que el control absoluto mantuvo al 90% de la población viva, mientras que el control con peróxido mantuvo al 15% de su población viva, esto durante las 6 horas del ensayo, posteriormente encontramos al café oscuro el cual mantuvo al 90% de la población igualándose con el control, lo cual sugiere que ejerce efecto modulando genes de resistencia a estrés oxidativo a través de la vía de respuesta a la insulina, por otro lado, el café claro, solo perdió al 40% de su población, mantuvo al 60% de su población viva hasta la hora 6 del ensayo.

El café industrial soluble se encuentra en la figura 11 (C), en donde encontramos al control absoluto con el 91.5% de su población viva hasta la hora 6, para el control con peróxido se mantuvo al 17% de la población viva hasta la hora 6. El café industrial con cafeína demostró tener una muy buena protección ante el estrés oxidativo, casi igualándose al control el cual contenía el 0% de (H₂O₂), perdió solo el 8% de su población durante las 6 horas.

(A)



(B)



(C)

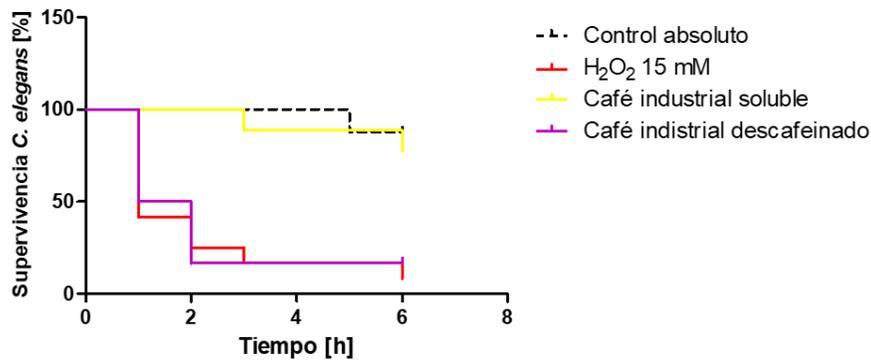


Figura 11: Efecto del café en la protección al estrés oxidativo en *C. elegans* en (GR1339 *daf-2*). (A) Preparación por infusión; (B) Preparación en cafetera de vapor; (C) Cafés industriales. n=6.

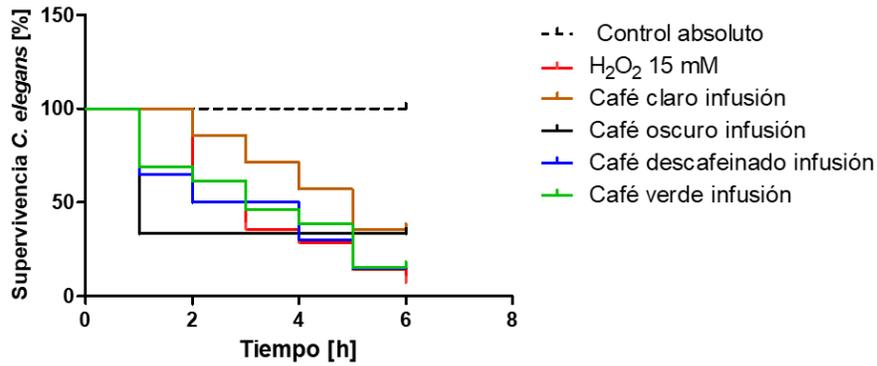
8.8 Efecto de los compuestos químicos del café gourmet e industrial, frente al estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno en la cepa CF1038 *daf-16*

Adicionalmente se indujo el estrés oxidante en *C. elegans* en la cepa CF1038, cepa mutante en el gen *daf-16*, el cual también tiene relación con la longevidad. En *C. elegans* DAF-16 es el ortólogo a FOXO en mamíferos y se activa en respuesta a altos niveles de estrés oxidante, controla la transcripción de varios genes antioxidantes y chaperones que retrasan el envejecimiento (Mukhopadhyay y col., 2006). Nuestros resultados mostraron lo siguiente, en la figura 12 (A) se muestra al café por infusión en donde obtuvimos que en nuestro control absoluto se mantuvo al 100% de la población viva durante las 6 horas del ensayo, mientras que el control que contenía solo peróxido mantuvo solo al 13% de su población, posteriormente encontramos al café claro mantuvo al 37% de su población, en el café oscuro, se observa que la población decayó a la hora 1, al 32%, no obstante esta se mantuvo hasta la hora 6 del ensayo.

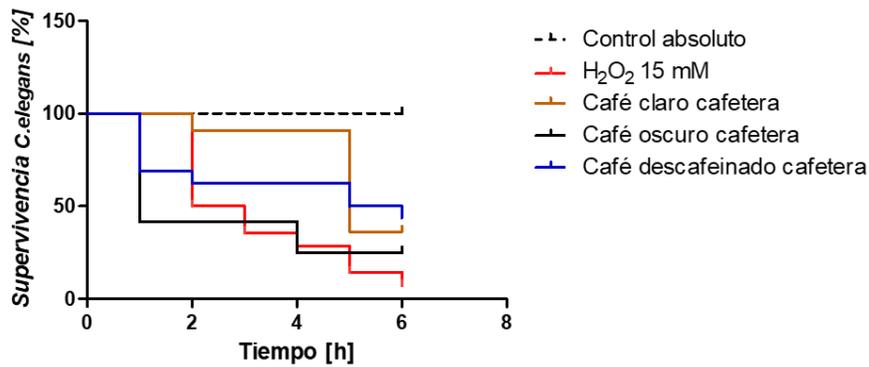
El café por una preparación por cafetera se muestra en la figura 12 (B) inicialmente se encuentra el control absoluto con el 100% de su población durante las 6 horas del ensayo, posteriormente se encuentra el control solo con peróxido de hidrógeno el cual mantuvo solo al 14% de su población viva, posteriormente encontramos que; el café claro mantuvo viva el 90% de su población hasta la hora 5, en la hora 6 decayó hasta el 25% se desconoce el evento que lo llevo a disminuir tanto la población, posteriormente se encuentra el café descafeinado el cual mantuvo al 41% de su población viva durante las 6 horas del ensayo.

El café industrial soluble se encuentra en la figura 12 (C) en donde observamos que el control absoluto mantuvo al 100% de la población viva, mientras que el control con peróxido mantuvo solo al 16% de su población viva durante la hora 6 del ensayo, posteriormente se encuentra el café industrial soluble con el 81% de su población viva, posteriormente se encuentra el café industrial sin cafeína y cómo podemos observar, mantuvo una pérdida total de su población a la hora 3 del ensayo.

(A)



(B)



(C)

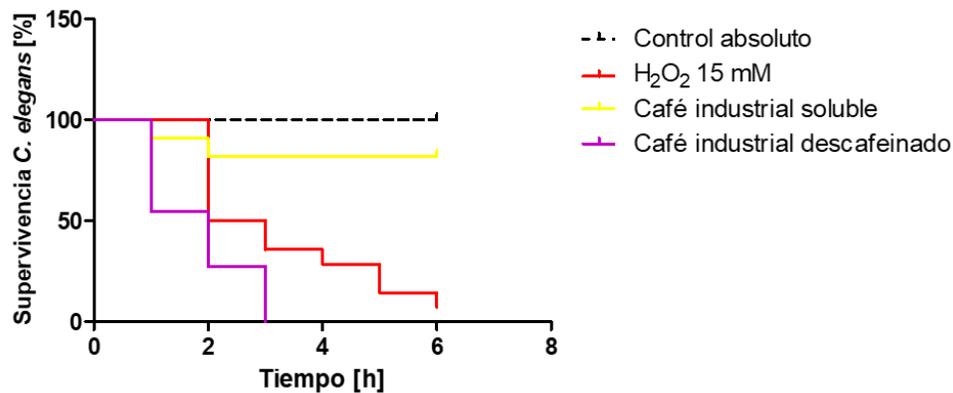


Figura 12: Efecto del café en la protección al estrés oxidativo en *C. elegans* (CF1038 *daf-16*). (A) Preparación por infusión; (B) Preparación en cafetera de vapor; (C) Cafés industriales. n=6.

IX. DISCUSIÓN

Como se sabe el estrés oxidativo es una de las principales etiologías en las enfermedades crónico-degenerativas, el cual es inducido por un estado redox desequilibrado entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes, lo que resulta en una acumulación excesiva de ROS. El estrés oxidativo está relacionado con el daño de la membrana celular por la peroxidación de lípidos, los cambios en la estructura y función de las proteínas debido a la oxidación de las mismas y el daño estructural al ADN. Lo cual puede inducir daño celular, deterioro del sistema de reparación del ADN, y disfunción mitocondrial, los cuales han sido conocidos como factores clave en la aceleración del proceso de envejecimiento y el desarrollo de trastornos neurodegenerativos (Kim y col., 2015).

Si bien no existe cura para las enfermedades crónico-degenerativas existen medicamentos los cuales pueden ayudar a retrasar la progresión de estas; sin embargo, estos medicamentos generan efectos secundarios adversos afectan así la calidad de vida de los pacientes, además de que tiene precios elevados, las enfermedades neurodegenerativas se han convertido en un problema que aqueja a la población en general, ya que son enfermedades que van al alza y en la actualidad no hay cura para ellas, es por ello que se han buscado alternativas naturales, las cuales retrasen la progresión de estas enfermedades.

El café (*Coffea arabica*) es conocido por ser una bebida de carácter universal el cual está compuesto por más de mil sustancias químicas entre las cuales destacan: aminoácidos, azúcares, vitaminas y minerales. Además, en su composición se incluyen ácidos clorogénicos con propiedades antioxidantes y la cafeína una xantina con propiedades estimulantes del sistema nervioso central (Gottleland y de Pablo, 2007), dichos compuestos químicos se ha demostrado que pueden prevenir o retrasar algunos tipos de daños a las células neutraliza los radicales libres producidos por el metabolismo de las células y el estrés oxidativo (Mayor-Oxilia, 2010).

En nuestro estudio se utilizaron las infusiones de café partiendo del café verde, tostado claro, oscuro, café descafeinado gourmet y café industrial con y sin cafeína, las cuales

se prepararon por dos métodos distintos, por infusión convencional y por cafetera de vapor, y como modelo biológico de estudio se utilizó al nematodo *Caenorhabditis elegans*, para entender como estos procesos en la preparación de esta bebida, pueden influir en las propiedades protectoras que han sido reportadas.

Inicialmente, para comprobar y justificar su actividad antioxidante y los beneficios hacia la salud que se le han atribuido al café, se realizaron pruebas *in vitro*, para determinar el contenido de compuestos fenólicos totales, basados en el método de Folin-Ciocalteu, en donde encontramos que el café oscuro por cafetera presento un mayor contenido de fenoles totales con un 38 mg EAG/g, muestran 18% más de fenoles totales que el café claro por infusión, posteriormente se realizó una cuantificación de cafeína por cromatografía líquida, siendo el café industrial soluble con cafeína el que obtuvo un mayor contenido de cafeína con respecto a los café gourmet hasta con un 23% más de cafeína (figura 6). Moratallaa y col. (2008), mencionaron que la cafeína ha demostrado tener efectos neuroprotectores, lo cual se puede deber a que este alcaloide actúa como estimulante del sistema nervioso central (SNC) produce un incremento en el rendimiento intelectual objetivo y subjetivo, aumenta la capacidad de concentración y de atención. Por otro lado, Pardo y col. (2007), de acuerdo a sus datos mostrados en su trabajo el café tostado, mostró un contenido de 83 mg de cafeína por cada 150 mL, no obstante, no especifican que grado de tostado presenta el café, que cantidad en peso/gramos de café se disolvió en cuanto volumen de disolvente para obtener este contenido de cafeína, ni tampoco se menciona que tipo de preparación se utilizó para llegar a estos valores presentados. No obstante, en nuestro ensayo en la determinación de cafeína por HPLC, el café claro, por una preparación de infusión, mostró un contenido de cafeína de 81.95 µg/mL de cafeína, el café que presentó un mayor contenido de café fue el café industrial soluble, con valores de 108 µg/mL de cafeína.

La capacidad antioxidante es determinada por interacciones sinérgicas entre diferentes compuestos y por el modo de acción de cada uno, por lo tanto, es necesario evaluar esta capacidad por diferentes estrategias, es por ello que en este mismo estudio se realizaron las pruebas *in vitro* de DPPH[·], ABTS^{·+} y FRAP. La infusión de café industrial con cafeína tuvo una excelente actividad antioxidante *in vitro* a través de la eliminación

de radicales como DPPH•, también presentó la mayor actividad antioxidante en la reducción de Hierro (FRAP), sugiriendo una alta posibilidad de tener efectos antioxidantes *in vivo* (figura 10), esto indica que el café industrial con cafeína, tiene más compuestos sencillos, ácidos fenólicos, que fácilmente entran al sitio activo del radical y lo pueden neutralizar, no obstante, el café soluble industrial sin cafeína, seguido del café claro por infusión tiene compuestos más complejos como los flavonoides con capacidad de neutralizar radicales como el ABTS^{•+}; sin embargo, estos radicales son artificiales y no reflejan de manera adecuada la situación que se presenta en condiciones *in vivo*.

Por otro lado, se realizaron pruebas *in vivo* en *C. elegans*, en las cuales se indujo el estrés químicamente con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Para este ensayo se emplearon las cepas: silvestre N2, GR1339 *daf-2* y CF1038 *daf-16*; GR1339 *daf-2* codifica un receptor insulínico en *C. elegans*. Las mutaciones en este gen en *C. elegans* aumentan su esperanza de vida. Se conoce que este gen es el encargado de regular el desarrollo reproductivo, el envejecimiento, el estrés oxidativo, la tolerancia a la temperatura, la resistencia a la hipoxia y también la resistencia a bacterias patógenas. *daf-2* es el único factor de crecimiento insulínico tipo 1 o IGF-1. La señalización de esta proteína se ha conservado de *C. elegans* a humanos, *daf-2* actúa negativamente en la regulación del factor forkhead de transcripción *daf-16* a través de una cascada de fosforilación. Un análisis genético revela que *daf-16* es necesario para la señalización de *daf-2*, y que influyen en el aumento de la esperanza de vida *C. elegans*. Cuando no se encuentra fosforilado, *daf-16* se encuentra activo y presente en el núcleo y promueve la transcripción de genes asociados a la tolerancia de estrés oxidativo (Garigan y col., 2002).

Nuestros resultados de las pruebas *in vivo* en la cepa N2, arrojaron que los cafés que brindan mejor protección ante el estrés oxidativo inducido químicamente con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) son: el café oscuro, manteniendo al 100% de su población viva, seguido del café claro por infusión, con un 60% de su población viva frente al estrés oxidativo por (H₂O₂), el café oscuro y el café claro por cafetera mantuvieron al 75% de su población viva, frente al estrés oxidativo, mientras que el café soluble industrial con

cafeína mantuvo solo al 60% de su población, lo cual nos lleva a deducir que la cafeína si ejerce papel antioxidante ante el estrés oxidativo.

Posteriormente en nuestras pruebas *in vivo* en la cepa GR1339 *daf-2*, obtuvimos que, el café industrial con cafeína, ofrece una buena protección al nematodo *C. elegans* ante el estrés oxidativo por (H_2O_2), ya que fue capaz de mantener al 93% de su población, el café oscuro por cafetera mantuvo viva al 92%, mientras que, el café claro por infusión mantuvo solo al 67% de su población viva frente al estrés oxidativo por (H_2O_2), para la cepa CF1038 *daf-16*, resultó brindar una mejor actividad antioxidante el café industrial con cafeína mantuvo al 81% de su población viva hasta la hora 6, brinda una protección ante el estrés oxidativo, como se puede observar obtuvimos buenos resultados del café soluble industrial con cafeína, en varias de nuestras pruebas *in vitro* como en las pruebas *in vivo* en las diferentes cepas.

En nuestra investigación, hemos presentado evidencias de: 1) el contenido de fenoles totales de nuestras diferentes infusiones de café, 2) pruebas de eliminación de radicales sintéticos como DPPH⁻, ABTS⁺ y actividad antioxidante en la reducción de Hierro (FRAP), así como también, 3) pruebas *in vivo* ante la resistencia al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 15 mM, los compuestos químicos antioxidantes del café como los polifenoles, no necesariamente puede ejercer un mecanismo directo, eliminando especies reactivas de oxígeno o quelando iones metálicos de transición, para evitar la formación de ROS producidas por las reacciones Fenton (Brandt y col. ,2004), sino, que además, esto puede ser un efecto indirecto derivado de otros procesos no estudiados, no obstante, en la protección de los polifenoles presentes en las infusiones de café, podrían ser un efecto inicial del decremento en ROS intracelulares en *C. elegans*. El aumento en la longevidad de *C. elegans* está relacionado con un efecto indirecto de las infusiones de café ya que actúa como modulador genético de factores transcripcionales que por consiguiente regularan enzimas antioxidantes.

X. CONCLUSIÓN

El café oscuro, por una preparación por infusión, presenta una capacidad favorable para modular la actividad antioxidante frente al estrés oxidativo inducido en *C. elegans* por peróxido de hidrógeno

XI. PERSPECTIVAS

Los datos mostrados en nuestro estudio abordan nuevas preguntas acerca de los componentes químicos presentes en el café, es necesario demostrar el resultado de diferentes concentraciones y/o proporciones, así como usar un modelo biológico distinto para interpretar estos resultados, ya que el café es considerado un potencial nutracéutico.

1. Determinar cuáles son los compuestos químicos que intervienen en los procesos de protección ante el estrés oxidativo y longevidad en *Caenorhabditis elegans*.
2. Evaluar la participación de los compuestos químicos del café en las enfermedades crónico-degenerativas
3. Uso de modelos de ratones para el estudio de enfermedades asociadas a estrés oxidativo.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adachi, H., Fujiwara, Y., & Ishii, N. 1998. Effects of Oxygen on Protein Carbonyl and Aging in *Caenorhabditis elegans* Mutants With Long (*age-1*) and Short (*mev-1*) Life Spans. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 53A (4), B240–B244. doi:10.1093/gerona/53a.4.b240
2. Altintas, O.; Park, S.; Lee, S.J.V. The role of insulin/IGF-1 signaling in the
3. longevity model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Reports*. 2016, 49, 81-2.
4. Alzheimer's Disease International, 2019. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. The Global Voice on Dementia.
5. B., Mukhopadhyay, Deplancke, A., Ao, W., Elewa, A. M., Grove, C. A., Martinez, N. J., Walhout, A. J. M. 2006. A Gene-Centered *C. elegans* Protein-DNA Interaction Network. *Cell*, 125(6), 1193–1205. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.038
6. Brandt, K.; Christensen, L.P.; Hansen- Møller, J.; Hansen, S.L.; Haraldsdottir, J.; Jespersen, L. Health promoting compounds in vegetables and fruits: a systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trend. Food. Sci Technol*. 2004, 15, 384-93.
7. Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974, 94, 77-7.
8. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem*. 1996, 239, 70-76

9. Barbieri, M.; Bonafe, M.; Franceschi, C.; Paolisso, G. Insulin/IGF- I-signaling pathway: an evolutionarily conserved mechanism of longevity from yeast to humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003, 285, E1064–E1071.
10. Barsyte, D.; Lovejoy, D.A.; Lithgow, G.J. Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 2001, 15, 627–634.
11. Blackwell, T. K.; Steinbaugh, M.J.; Hourihan, J.M.; Ewald, C.Y.; Isik, M. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Biol. Med.* 2015, 88, 290–301.
12. Carvajal Carvajal, Carlos. 2016. Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Medicina Legal de Costa Rica*, 33(2), 104-122
13. Carvajal Carvajal, Carlos. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
14. Cunza, S, S,; Pillihuaman, Elvi Alfaro, & Roca, Emilio German Ramírez. (2020). Actividad antioxidante, polifenoles y flavonoides de *Coffea arabica* de cinco regiones peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(4), 343-354. <https://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v86i4.307>
15. Dinkova-Kostova, A.T.; Holtzclaw, W.D.; Cole, R.N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99, 908–13.
16. Ďuračková, Z. Free Radicals and Antioxidants for Non-Experts. *Sys. Biol. Free Rad. Antiox.* 2014, Pp., 3-38.

17. Estrada, A. E., & Zomosa, V. C. 2017. Papel de la Agregación del Péptido Beta Amiloide en la Enfermedad de Alzheimer. Revista de Educación Bioquímica (REB) 36(1):2-11, <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2017/reb171b.pdf>
18. Espinoza-Diez, C.; Miguel, V.; Mennerich, D.; Kietzmann, T.; Sáncgez- Pérez, P.; Cadenas, P.; Lamas, S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative streess. Red. Biol, 2015. 6, 183-197.
19. Fridovich, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Ann. Rev. Biochem. 1995, 64, 97-112.
20. Garigan, D.; Hsu, A.L.; Fraser, A.G.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Kenyon, C. Genetic analysis of tissue aging in Caenorhabditis elegans: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. Genetics 2002, 161, 1101-1112.
21. Gómez-Chavarín M, Roldan-Roldan G., Morales-Espinosa R, Pérez-Soto G, Torner-Aguilar C. 2012. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson, 1: 25-33.
22. Gotteland, M., y de Pablo V, S. 2007. Algunas Verdades Sobre El Café. Revista chilena de nutrición, 34(2), 105-115
23. Gutiérrez, L. M., García, M. C., Roa, P. A., & Martínez, A. 2017. La Enfermedad de Alzheimer y otras demencias como problema nacional de salud [Libro electrónico]. Inter Sistemas. https://www.anmm.org.mx/publicaciones/ultimas_publicaciones/ANM-ALZHEIMER.pdf

24. Eskelinen, M. H., Ngandu, T., Tuomilehto, J., Soininen, H., & Kivipelto, M. 2009. Midlife Coffee and Tea Drinking and the Risk of Late-Life Dementia: A Population-Based CAIDE Study. *Journal of Alzheimer's Disease*, 16(1), 85–91.
25. Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 1996, 16, 33–50.
26. Henderson, S.T.; Johnson, T.E. *daf-16* integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 2001, 11, 1975–1980.
27. Hsu, A.L.; Murphy, C.T.; Kenyon, C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 2003, 300, 1142–1145.
28. Herman Lara H, Alanís-Garza E. E., Estrada Puente, M. F., Mureyko, L. L., Alarcón Tores, D. A., Ixtepan Turrent, L. 2015. Nutrición que previene el estrés oxidativo causante del Alzheimer. *Prevención del Alzheimer, Gac Med Mex.* 2015;151:245-51
29. Huang, T.-C., Lu, K.-T., Wo, Y.-Y. P., Wu, Y.-J., & Yang, Y.-L. 2011. Resveratrol Protects Rats from A β -induced Neurotoxicity by the Reduction of iNOS Expression and Lipid Peroxidation. *PLoS ONE*, 6(12), e29102. doi: 10.1371/journal.pone.0029102
30. Hu Yang Iván, de la Rubia Ortí José Enrique, Selvi Sabater Pablo, Sancho Castillo Sandra, Rochina Mariano Julián, Manresa Ramón Noemí, Montoya-Castilla Inmaculada 2015. Aceite de coco: tratamiento alternativo no farmacológico frente a la enfermedad de Alzheimer. *Nutr Hosp.* 2015;32(6):2822-2827
31. Katic, M.; Kahn, C.R. The role of insulin and IGF-1 signaling in longevity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005, 62,320–343.

32. Kenyon, C.; Chang, J.; Gensch, E.; Rudner, A.; Tabtiang, R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993, 366, 461-464.
33. Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 325.
34. Kimura, K.D.; Tissenbaum, H.A.; Liu, Y.; Ruvkun, G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997, 942-946.
35. Koch, K.; Haverman, S.; Büchter, C.; Wätjen, W. *Caenorhabditis elegans* as model system in pharmacology and toxicology: Effects of flavonoids on Redox-Sensitive signaling pathways and ageing. *Sci world J.* 2014, 2014, 920398
36. Lim, H. J., Shim, S. B., Jee, S. W., Lee, S. H., Lim, C. J., Hong, J. T., Hwang, D. Y. 2013. Green tea catechin leads to global improvement among Alzheimer's disease-related phenotypes in NSE/hAPP-C105 Tg mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(7), 1302–1313. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.10.005
37. Lin, K.; Hsin, H.; Libina, N.; Kenyon, C. Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat. Genet.* 2001, 28, 139–145.
38. Lithgow G, J, White, T M, Melov, S, Johnson, T ,E. ermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutations and induced by thermal stress.
39. Proceedings of the National Academy of Sciences Aug 1995, 92 (16) 7540-7544; DOI: 10.1073/pnas.92.16.7540
40. Lee, S.J.; Murphy, C.T.; Kenyon, C. Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF- 16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell. Metab.* 2009, 10, 379-391.

41. Margis, R.; Dunand, F. K.; Margis-Pinheiro, M. Glutathione peroxidase family-an evolutionary. *Clin, Biochem* 1999, 32, 595-603.
42. Markaki, M., & Tavernarakis, N. 2010. Modeling human diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Biotechnology Journal*, 5(12), 1261–1276. doi:10.1002/biot.201000183
43. Enfermedad de Parkinson - Síntomas y causas - Mayo Clinic. 2019. Mayo Clinic. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/parkinsons-disease/symptoms-causes/syc-20376055>
44. Mayor-Oxilia, R. 2010. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29.
45. Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 17205–8.
46. MedlinePlus, (2021). Antioxidantes, Medline plus. <https://medlineplus.gov/spanish/antioxidants.html>
47. Monn, J.; Shibamoto, T.; Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1655-1666.
48. Moratalla, R. 2008. Neurobiología de las metilxantinas. *Trastornos Adictivos*, 10, 3, 201-207.
49. Murakami, S.; Johnson, T.E. A genetic pathway conferring life extension and resistance to UV stress in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1996, 143, 1207-1218.

- 50.** Murphy, C.T.; McCarroll, S.A.; Bargmann, C.I.; Fraser, A.; Kamath, R.S.; Ahringer, J.; Li, H.; Kenyon, C. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2003, 424, 277–283.
- 51.** A. Mukhopadhyay, S.W. Oh, H.A. Tissenbaum. Worming pathways to and from DAF-16/FOXO. *Exp. Gerontol.*, 41 (2006), pp. 928-934
- 52.** Ndhlala, A.R.; Moyo, M.; Van, S.J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules* 2010, 15, 6905–30.
- 53.** Ogg, S.; Paradis, S.; Gottlieb, S.; Patterson, G.I.; Lee, L.; Tissenbaum, H.A.; Ruvkun, G. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 1997, 389, 994–999.
- 54.** Oliveira, R. P.; Porter, J.; Dilks, K.; Landis, J.; Ashraf, J. Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* 2009, 8, 524–541.
- 55.** Pardo Lozano, Ricardo, & Alvarez García, Yolanda, & Barral Tafalla, Diego, & Farré Albaladejo, Magí. 2007. Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, 19(3), 225-238
- 56.** Perfect Daily Grind., 2018, Control En La Temperatura Del Agua: Cómo Preparar Un Mejor Café., <https://perfectdailygrind.com/es/2018/04/25/control-en-la-temperatura-del-agua-como-preparar-un-mejor-cafe/>
- 57.** Perfect Daily Grind., 2019, Cómo el Procesamiento Influye en la Química y el Sabor Del Café, <https://perfectdailygrind.com/es/2019/07/01/como-el-procesamiento-influye-en-la-quimica-y-el-sabor-del-cafe/>

58. Puerta Quintero, G. I. 2011. Composición Química De Una Taza De Café. Ciencia, tecnología e innovación para la caficultura colombiana. Cenicafe, 7(1), 7-9,
59. Quitschke, W. W., Steinhauß, N., & Rooney, J. (2013). The effect of cyclodextrin-solubilized curcuminoids on amyloid plaques in Alzheimer transgenic mice: brain uptake and metabolism after intravenous and subcutaneous injection. *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(2), 16. doi:10.1186/alzrt170
60. Rubio-Landa, M. Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante in vitro e in vivo en frijol criollo y comercial bajo diferentes métodos de cocción. Tesis de maestría. 2017.
61. Sakamoto, T.; Maebayashi, K.; Nakagawa, Y.; Imai, H. Deletion of the four phospholipid hydroperoxide genes accelerates aging in *Caenorhabditis elegans*. *Gen Cells* 2014, 19, 778-7792.
62. Secretaria de Salud. 2015. Plan de Acción de Promoción de la Salud en Enfermedades Crónico-Degenerativas. <https://salud.michoacan.gob.mx/wp-content/uploads/2015/10/degenerativos.pdf>
63. Shapira, M., & Tan, M.-W. 2008. Genetic Analysis of *Caenorhabditis elegans* Innate Immunity. *Innate Immunity*, 429–442. doi:10.1007/978-1-59745-570-1_25
64. Shore, D. E.; Ruvkun, G. A cytoprotective perspective on longevity regulation. *Trends Cell Biol.* 2013, 23, 409–420.
65. Tissenbaum, H.A. Using *C. elegans* for aging research. *Invertebr Reprod Dev.* 2014, 30, 59-63

66. Tysnes, O.-B., & Storstein, A. 2017. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 124(8), 901–905. doi:10.1007/s00702-017-1686-y
67. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2019. Padecen Parkinson más de 7 millones de personas en el mundo. *Gaceta UNAM*. <https://www.gaceta.unam.mx/padecen-parkinson-mas-de-7-millones-de-personas-en-el-mundo/>
68. Van Bulck, M., Sierra-Magro, A., Alarcon-Gil, J., Perez-Castillo, A., & Morales-Garcia, J. 2019. Novel Approaches for the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 719.
69. Van-Raamsdonk, J.M.; Hekimi, S. Reactive Oxygen Species and Aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or Casual Relationship?. *Antiox. Redox Sign.* 2010, 13, 1911-1953.
70. Virgen-Ortiz Jose Juan 2020, Método de cuantificación de cafeína, Método no publicado
71. Wan, C.; Yu, Y.; Zhou, S.; Liu, W.; Tian, S.; Cao, S. Antioxidant activity and free radical- scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmac Mag.* 2011, 7, 40-45.
72. Yang, W.; Li, J.; Hekimi, S. A measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 2007, 177, 2063–2074.

XIII ANEXO

MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFER UTILIZADOS

Tabla A 1. Nematode Growth Medium (NGM)

Cloruro de sodio (NaCl)	2 g/L
Peptona de caseína	4 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) 1M	3 g/L
Fosfato de potasio dibásico (K ₂ HPO ₄) 1M	0.5 g/L
Colesterol 5mg/mL	1 mL
Agar	20 g/L

Tabla A 2. Buffer M9

Cloruro de sodio (NaCl)	5 g/L
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) 1M	3 g/L
Fosfato de sodio dibásico (NaHPO ₄) 1M	6 g/L
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) 1M	1mL

Table A 3. Luria-Bertani (LB)

Cloruro de sodio (NaCl)	10g/L
Peptona de caseína	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Agar	20 g/L

