



---

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**TESIS**

**Estudio de la infusión de café oscuro en la prevención de enfermedades neurodegenerativas en *Caenorhabditis elegans***

**P R E S E N T A:**

**LBT. Brianda Lizbeth Paz Cruz**

**ASESOR:**

**D.C. Josué Altamirano Hernández**

**COMITE SINODAL**

D.C. Asdrúbal Aguilera Méndez

D.C. Jesús Campos García

D.C. Homero Reyes de la Cruz

D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
UMSNH**

Morelia Michoacán, febrero 2025

# Índice

I. Resumen.....	6
II. Abstract.....	7
III. Introducción.....	8
IV. Antecedentes.....	10
4.1 Enfermedades neurodegenerativas .....	10
4.2 Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas .....	11
4.3 Enfermedad del Alzheimer .....	12
4.4 Enfermedad de Parkinson .....	14
4.5 Enfermedad de Huntington .....	14
4.6 FoxO en las enfermedades neurodegenerativas.....	16
4.7 Especies reactivas de oxígeno .....	17
4.7.1 Generación de especies reactivas de oxígeno en el cerebro.....	17
4.8 Sistema de defensa antioxidante .....	18
4.9 Tratamiento farmacológico de la EA .....	19
4.11 Tratamientos alternativos no farmacológicos para las EN.....	20
4.12 Alimentos funcionales .....	21
4.13 El café como alimento funcional .....	25
4.13.1 Composición química del café.....	25
4.13.2 Contenido de ácidos clorogénicos en el café .....	26
4.13.3 Contenido de cafeína en el café .....	27
4.14 Actividad farmacológica de las xantinas.....	27
4.15 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo biológico en el estudio de EN .....	28
4.16 La glucosa como agente oxidante para inducir la producción de EROS en <i>C. elegans</i> .....	29
4.17 Estrategias de defensa frente al estrés oxidativo en <i>C. elegans</i> .....	30
4.17.1 Moléculas de bajo peso molecular .....	31
4.17.2 Factores de transcripción implicados en estrés oxidante .....	33
V. Justificación.....	36
VI. Hipótesis.....	37
VII. Objetivos .....	37
7.1 Objetivo general .....	37
7.2 Objetivos particulares.....	37
VIII. Materiales y Métodos .....	38
8.1 Material biológico.....	38
8.2 Preparación de las infusiones de café .....	39
8.3 Cuantificación de compuestos fenólicos .....	39
8.4 Cuantificación de cafeína .....	39
8.5 Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> .....	40
8.5.1 Método DPPH- .....	40
8.5.2 Método ABTS+.....	40
8.5.3 Método FRAP .....	41
8.6 Sincronización de <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	41
8.7 Ensayo de resistencia a estrés oxidante en <i>C. elegans</i> .....	41
8.8 Ensayo de quimiotaxis .....	42
8.8.1 Ensayo de dosis efectiva 50 DE50 .....	42

8.9 Análisis estadístico .....	43
IX. Resultados .....	43
9.1 Contenido de compuestos fenólicos totales en el café .....	43
9.2 Contenido de cafeína de las infusiones de café.....	45
9.3 Actividad antioxidante <i>in vitro</i> .....	46
9.4 Actividad antioxidante <i>in vivo</i> .....	50
9.5 Determinación de la dosis efectiva 50 .....	51
9.6 Evaluación del efecto neuroprotector de las infusiones de café.....	52
X. Discusión .....	56
XI. Conclusiones.....	62
XII. Bibliografía.....	63

## **Abreviaturas**

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

A $\beta$ : péptido  $\beta$ -amiloide

AC: ácidos clorogénicos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosin Trifosfato

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

EH: enfermedad de Huntington

EN: enfermedades neurodegenerativas

EP: enfermedad de Parkinson

EROS: especies reactivas de oxígeno

ERN: especies reactivas de nitrógeno

FOXO: forkhead box, sub-grupo O

FRAP: Poder Antioxidante Reductor de Hierro

FudR: Fluorodesoxiuridina

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación reducido

GST: Glutati3n-S-transferasa

HPLC-DAD: Cromatograf3a l3quida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Per3xido de hidr3geno

IGF: Factor de crecimiento insul3nico

NADP: Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato

NFT: agregados neurofibrilares intracelulares

NGM: Medio de crecimiento de nematodos

NRF: Factor nuclear eritroide

OH•: Radical hidroxilo

O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>: Radical super3xido

Ani3n s3per 3xido (O<sub>2</sub>)

pH: Potencial de hidrogeniones

RL: radical libre

RE: ret3culo endoplasm3tico

RNA: 3cido ribonucleico

RSS: Especies Reactivas del Azufre

SKN: SKiNhead

SOD: Super3xido dismutasa

SOD/CuZn: Super3xido dismutasa dependiente de cobre y zinc

SOD/Mn: Super3xido dismutasa dependiente de manganeso

## I. Resumen

Se ha registrado un incremento significativo en la prevalencia de enfermedades neurodegenerativas, los síntomas más frecuentes de éstas incluyen pérdida de la memoria, falta de coordinación, cambios del estado de ánimo y pérdida de las inhibiciones. Existen en diversos tratamientos farmacológicos que disminuyen la progresión de la enfermedad, pero generan efectos secundarios adversos en el paciente, por lo cual se buscan nuevas alternativas constantemente para su tratamiento. Numerosos estudios han demostrado una correlación positiva entre la ingesta moderada de café con la prevención de la neurodegeneración y una mayor capacidad de retención de la memoria. Además, se ha reportado que el grado de tostado del café altera el perfil de metabolitos presentes en el grano, lo cual debe afectar su capacidad neuroprotectora. Por lo anterior, fue de interés evaluar el impacto del tostado del café gourmet sobre las propiedades neuroprotectoras de la bebida, contrastándolo con el café soluble industrial.

Se determinó el contenido de fenoles totales y cafeína, la actividad antioxidante *in vitro* e *in vivo*; se utilizó el modelo de neurodegeneración por hiperglucemia en *Caenorhabditis elegans* evaluando el índice de quimiotaxis, en cual se fundamenta en registrar la conservación de la memoria asociativa entre un quimioatrayente y el alimento. En los resultados se observó que las infusiones de café gourmet presentaron un mayor contenido de fenoles totales en comparación al café industrial, pero el contenido de cafeína fue mayor en el café industrial. En la evaluación antioxidante se encontró que en las pruebas *in vitro* el café industrial presentó una mejor actividad, pero en la prueba *in vivo*, las infusiones de café gourmet resultaron superiores al café industrial. Con respecto a la capacidad de neuroprotección, se observó que en la condición de hiperglucemia el nematodo *C. elegans* pierde la memoria a corto plazo, reflejado como un índice de quimiotaxis negativo. En los tratamientos de hiperglucemia adicionados con las infusiones de café gourmet tueste claro y oscuro, se redujo el índice de quimiotaxis un 35% en comparación al control sin hiperglucemia, mientras que en café industrial se redujo este índice en un 73%. Los cafés descafeinados, tanto gourmet como industrial no mostraron ningún efecto neuroprotector.

**Palabras clave:** neuroprotección, café gourmet, quimiotaxis, memoria corto plazo, *Caenorhabditis elegans*

## II. Abstract

There has been a significant increase in the prevalence of neurodegenerative diseases, the most frequent symptoms of which include memory loss, lack of coordination, mood swings and loss of inhibitions. There are various pharmacological treatments that slow the progression of the disease, but they generate adverse side effects in the patient, which is why new alternatives are constantly being sought for its treatment. Numerous studies have shown a positive correlation between moderate coffee intake and the prevention of neurodegeneration and a greater capacity for memory retention. In addition, it has been reported that the degree of coffee roasting alters the profile of metabolites present in the bean, which should affect its neuroprotective capacity. Therefore, it was of interest to evaluate the impact of gourmet coffee roasting on the neuroprotective properties of the drink, contrasting it with industrial soluble coffee.

The content of total phenols and caffeine, the antioxidant activity in vitro and in vivo, and the antioxidant activity in vitro and in vivo were determined. The hyperglycemic neurodegeneration model was used in *Caenorhabditis elegans*, evaluating the chemotaxis index, which is based on recording the conservation of associative memory between a chemoattractant and food. The results showed that gourmet coffee infusions had a higher content of total phenols compared to industrial coffee, but the caffeine content was higher in industrial coffee. In the antioxidant evaluation, it was found that in vitro tests industrial coffee had better activity, but in the in vivo test, gourmet coffee infusions were superior to industrial coffee. Regarding the neuroprotection capacity, it was observed that under hyperglycemic conditions the nematode *C. elegans* loses short-term memory, reflected as a negative chemotaxis index. In hyperglycemia treatments with light and dark roast gourmet coffee infusions, the chemotaxis index was reduced by 35% compared to the control without hyperglycemia, while in industrial coffee this index was reduced by 73%. Decaffeinated coffees, both gourmet and industrial, did not show any neuroprotective effect.

**Key words:** neuroprotection, gourmet coffee, chemotaxis, short-term memory, *Caenorhabditis elegans*.

### III. Introducción

El envejecimiento es un fenómeno complejo, que generalmente se acepta como el punto de partida de diversas patologías crónico degenerativas. El deterioro funcional provocado por el envejecimiento constituye un factor de riesgo clave para las enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como el cáncer, trastornos cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas (EN) (Currais, 2015; Li et al., 2018a; Lv et al., 2018).

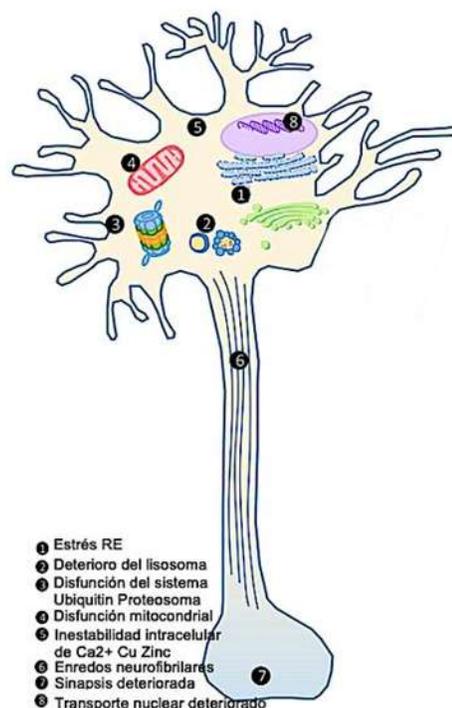
Este deterioro es irreversible en el sistema nervioso central (SNC) el cual está estrechamente relacionado con la morbilidad y la mortalidad en la población de edad avanzada (Bialystok et al., 2016). Las EN, incluidas la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), y la enfermedad de Huntington (EH), por mencionar algunas, están involucradas en una etapa preclínica, que puede durar décadas, así como en un proceso implacable de disfunción neuronal y finalmente degeneración, conduciendo a la muerte (Saxena y Caroni, 2011). 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, afectando la calidad de vida de los pacientes (Brightfocus, 2017). Por lo anterior, se han buscado alternativas naturales para retardar o disminuir la progresión de las enfermedades neurodegenerativas, para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Los alimentos funcionales son productos alimenticios de origen animal o vegetal que se consumen en la dieta diaria que no solo proporcionan nutrientes, sino que poseen compuestos bioactivos (Drago y col., 2006) una alternativa natural 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 SNC (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). En este trabajo se evaluará el efecto antioxidante de la infusión del café tostado oscuro 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 los compuestos bioactivos del café tostado oscuro, en la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

## IV. Antecedentes

### 4.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son trastornos caracterizados por una disminución gradual, progresiva y selectiva de las funciones del sistema nervioso. La etiología de estas fisiopatologías sigue siendo desconocida (Alarcón-Aguilar y col., 2019), es por ello que es importante estudiar las razones detrás de estas condiciones y realizar ensayos de compuestos químicos naturales que podrían tener potencial para curar, prevenir o retrasar la aparición de enfermedades neurodegenerativas como lo son el Alzheimer el Parkinson y el Huntington. Existen ocho eventos principales (figura 1) en los procesos biológicos celulares relacionados con la neurodegeneración: el proceso de plegamiento incorrecto de proteínas, lo cual inhibe el tráfico de Golgi en el Retículo Endoplásmico (RE) y altera la degradación asociada con este, lo que induce el estrés del RE (Mercado y col., 2013), los lisosomas dañados interrumpen los procesos que mantienen la homeostasis lisosomal (Schneider y Zhang., 2010), la acumulación de proteínas mal plegadas genera retroalimentación positiva que exacerba otros efectos (Ciechanover y Kwon., 2015), el mantenimiento mitocondrial disfuncional afecta directamente la biogénesis mitocondrial y la inducción de autofagia (Shirakabe y col., 2016), por ejemplo, la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) y ATP en la célula, la homeostasis alterada genera una afluencia excesiva de calcio, cobre y zinc, debido a la tensión de emergencia y al estrés mitocondrial (Schneider y Zhang., 2010). Las vías de señalización en el orgánulo estresado o el citoplasma inducen las transducciones de las señales al núcleo, lo que provoca daño en el ADN (Chakraborty y col., 2013; Schumacher y col., 2005).



**Figura 1.** Diagrama esquemático de los mecanismos patológicos asociados a la neurodegeneración (Wang y col., 2017).

#### 4.2 Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas

El estrés oxidativo es una de las potenciales etiologías en las enfermedades neurodegenerativas, desempeña un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas dado que participa en multitud de mecanismos que inducen oxidación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, contribuyendo con ello, al daño cerebral progresivo. Entre estos mecanismos se encuentran la disfunción mitocondrial, generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROS) y nitrógeno (ERN), déficit de defensas antioxidantes, oligomerización de proteínas, producción de citoquinas y respuesta inflamatoria, alteración de la barrera hematoencefálica o disfunción del proteasoma. Todas estas disfunciones se han visto implicadas en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington por mencionar algunas (Sienes-Bailo y col.,

2022). 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: Anión súper óxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), Radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), Oxígeno singlete ( $O_2^{\circ}$ ), por mencionar algunas (Mayor-Oxilia, 2010).

El aumento del contenido intracelular de EROS y ERN sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula, proceso que está asociado con muchas enfermedades neurodegenerativas. Las EROS, como el superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), se generan durante la respiración aeróbica normal de las células. Es bien sabido que la producción de EROS aumenta con la edad, mientras que algunos de los mecanismos de defensa endógenos pueden disminuir. Si se altera el equilibrio entre EROS y los antioxidantes, las cantidades excesivas de EROS dañarán las células por la oxidación de proteínas, la rotura de cadenas de ADN / ARN, la peroxidación de lípidos o la formación de productos finales de glicosilación avanzada. Estos cambios en el cuerpo con el aumento de la edad conducen a un fenotipo de envejecimiento relacionado con la enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, en las etapas iniciales en los cerebros de pacientes con enfermedad del Alzheimer se observa un exceso de proteínas oxidadas, lípidos y ARN (Abe et al., 2002; Lovell et al., 1995; Markesbery & Lovell, 1998; Nunomura et al., 1999; Smith et al., 1991; Williams et al., 2006). También se ha encontrado oxidación del ADN, especialmente en el ADN mitocondrial (Mecocci et al., 1994; Prasad Gabbita et al., 1998). La desregulación redox puede ser causada por la ineficacia del sistema antioxidante endógeno para manejar un aumento en la producción de radicales libres, debido a una menor eficacia del sistema antioxidante endógeno en sí. Este estrés adicional puede causar daño a las moléculas biológicas que conducen a una muerte celular rápida, lo que resulta en neurodegeneración, (Ghandi y col., 2012; Tang y col., 2005).

#### **4.3 Enfermedad del Alzheimer**

La enfermedad del Alzheimer (EA), es un desorden neurodegenerativo caracterizado funcionalmente por un declive progresivo de las funciones cognitivas (Carvajal, 2016), produce

la pérdida irreversible de neuronas, particularmente en el neocórtex, 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 (Gutiérrez y col., 2017). Existen dos tipos de Alzheimer, la de inicio temprano a los 40 años y de inicio tardío a los 65 años, esta se divide en 3 etapas: leve (etapa temprana), moderada (etapa media), grave (etapa tardía), (Alzheimer Association., 2023).

La EA patológicamente se caracteriza por la pérdida de las sinapsis y dos tipos de agregados de proteínas específicos:

**1.** Depósitos de placas extracelulares del péptido  $\beta$ -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 péptido amiloide (APP) (Estrada y Zomosa, 2017). Las placas de  $A\beta$  pueden agotar el almacenamiento de iones de calcio ( $Ca^{2+}$ ) en el retículo endoplásmico, lo que resulta en una sobrecarga de  $Ca^{2+}$  citosólica. En respuesta al aumento de  $Ca^{2+}$  citosólico, los niveles endógenos de glutatión reducido (GSH) se reducen y las EROS pueden estar sobreacumuladas dentro de las células (Ferrero y col., 2008), Se sabe que  $A\beta$  se incorpora a las mitocondrias y se encuentra en la membrana interna, lo que hace posible una interacción directa con los complejos de la cadena respiratoria y otras proteínas mitocondriales (Hansson Petersen et al., 2008; Lustbader et al., 2004).

**2.** Agregados intracelulares llamados ovillos neurofibrilares (NFT) formados por la proteína tau hiperfosforilada (Van Bulck y col, 2019). La proteína tau la cual da lugar a la red de microtúbulos neuronales y su actividad está regulada por el estado de fosforilación de tau siendo esta una modificación post-transcripcional que regula la afinidad de unión de tau a los microtúbulos (Wang y col., 2016; L. Neve y col., 1986), Sin embargo, en la enfermedad del Alzheimer tau está hiperfosforilada y pierde su capacidad para unirse a los microtúbulos. El estrés oxidante inducido por EROS está emergiendo como un factor importante en la patogénesis de la enfermedad del Alzheimer, ya que se cree que la sobreproducción de EROS desempeña un papel crítico en la acumulación y deposición de  $A\beta$  (Bonda y col., 2010).

#### **4.4 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).

#### **4.5 Enfermedad de Huntington**

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad hereditaria de tipo autosómico dominante, con penetración completa y fenómeno de anticipación. El gen responsable, localizado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Tiene una amplia expresión, no sólo en el sistema nervioso (neuronas y glía), sino también en gran variedad de tejidos. Este gen codifica una proteína denominada huntingtina (Htt), vital la embriogénesis del sistema nervioso (SN) pero de la que no se conoce una función específica. La mutación radica en una expansión de repeticiones de tripletes CAG (citosina-adenina-guanina), que codifican una región poliglutamínica (poliQ) en el extremo N-terminal de la Htt. El gen normal contiene entre 9 y 35 copias, mientras que en los genes que causan la enfermedad el número de repeticiones de tripletes es superior a 36-40. Se trata de una de las al menos 10 enfermedades hereditarias autosómicas dominantes producidas por expansión excesiva de tripletes CAG en sus respectivas proteínas. En todas ellas el único

factor que comparten sus proteínas específicas es la expansión de las repeticiones de tripletes CAG, que se traducen en una expansión poliQ. Cuanto mayor es el número de repeticiones antes se manifiesta el proceso, lleva curso clínico más grave y las alteraciones neuropatológicas son más severas. La longitud de la expansión de trinucleótidos es inestable, de forma que los descendientes tienen diferente número de repeticiones que los progenitores. Además, en cada enfermo puede haber diferencias en la longitud de la expansión CAG según el tejido considerado (mosaicismo). El tamaño de las expansiones es particularmente inestable en los espermatozoides, y probablemente la meiosis repercute en gran medida en su inestabilidad, provocando aumento del número de repeticiones CAG, lo que explica que la transmisión paterna sea la que con mayor frecuencia provoca el fenómeno de la anticipación. Dentro del propio SNC la longitud de las expansiones es diferente según la región considerada; así, en estriado y corteza cerebral las expansiones CAG son más largas que en el cortex cerebeloso. (A. Martínez, A. Rábano., 2002).

La enfermedad de Huntington se asocia con proteínas mal plegadas y de agregación que interfieren con la homeostasis de las proteínas, lo que lleva a una disfunción celular. Las enfermedades de poliglutamina son causadas por una expansión de tripletes CAG en el gen HTT (Huntingtina), lo que resulta en una mutación que conduce a una elongación del tracto de poliglutamina, dando como resultado un producto de proteína HTT que es susceptible de agregación (mHTT) (Labbadia y Morimoto., 2013). Se ha demostrado que el mHTT reduce la expresión del coactivador- $\gamma$  del receptor  $\gamma$  activado por el proliferador de peroxisomas, alterando el nivel de enzimas antioxidantes y reduciendo la concentración de mitocondrias del cuerpo estriado, por lo que se ha demostrado que la mHTT desempeña un papel clave en la disfunción mitocondrial. Además, mHtt tiene efectos inhibidores directos sobre el complejo respiratorio II (Panov y col., 2002; Bossy-Wetzel y col., 2008). La inhibición del transporte de electrones mitocondrial puede dar lugar a niveles más altos de ROS, así como a una menor producción de ATP (Lin y col., 2006; Bossy-Wetzel y col., 2008).

Estas EN se encuentran entre las enfermedades más importantes relacionadas con el envejecimiento, se caracterizan típicamente por daño neuronal y un deterioro progresivo de la función neurológica durante el envejecimiento. Se han revelado pocos objetivos terapéuticos

eficaces para las EN; por tanto, es importante comprender la patogénesis de las EN. Los factores de transcripción Forkhead box O (FoxO) se han implicado en los mecanismos que regulan el envejecimiento y la longevidad. Las funciones de FoxO están reguladas por diversas modificaciones postraduccionales como: fosforilación, acetilación, ubiquitinación, metilación y glicosilación. Los FoxO ejercen efectos tanto perjudiciales como protectores sobre las EN. Por lo tanto, comprender la función precisa de los FoxO en las EN será útil para desarrollar estrategias de tratamiento adecuadas (Hu, Wei, y col., 2019).

#### **4.6 FoxO en las enfermedades neurodegenerativas**

Las EN se producen como resultado de procesos neurodegenerativos, como la agregación de proteínas, el plegamiento anormal de proteínas y el daño cerebral irreversible. Sobre la base de las funciones fundamentales de los FoxO en el desarrollo y la supervivencia neuronal, se ha establecido un fuerte vínculo entre los FoxO y las EN.

La familia FoxO incluye principalmente cuatro miembros (FoxO1, FoxO3, FoxO4 y FoxO6). En particular, FoxO1 y FoxO3, han sido implicados en diversas enfermedades, incluidas el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y el envejecimiento. Los FoxO pueden actuar como reguladores maestros del envejecimiento y la longevidad (Xin y col., 2017), Además, la estructura molecular y la capacidad de unión de los FoxO también están reguladas por varias moléculas rio arriba en el SNC. Los FoxO controlan aún más los niveles de expresión de varios genes, que posteriormente regulan numerosas vías, lo que resulta en alteraciones en la función neuronal y la respuesta al estrés en el cerebro que envejece. En particular, los FoxO están involucrados en la patogénesis de las EN (Hu, Wei, y col., 2019).

Como familia de factores de transcripción pleiotrópicos, los FoxO, están implicados en la regulación de una amplia gama de funciones neuronales que modulan críticamente el desarrollo neuronal y las EN, incluida la neurogénesis y la regeneración neuronal, la apoptosis y el estrés oxidativo (Hu, Wei, y col., 2019).

FoxO1 se expresa en niveles elevados en el cuerpo estriado y en los subconjuntos neuronales del hipocampo, mientras que FoxO3 se expresa más ampliamente en todo el cerebro, incluido el cerebelo, la corteza y todas las áreas del hipocampo.

#### **4.7 Especies reactivas de oxígeno**

Las especies reactivas del oxígeno (EROS), son compuestos que se derivan de la molécula de oxígeno (O<sub>2</sub>) por reducción química parcial, 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 las EROS; 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).

##### **4.7.1 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 EROS.
- 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 bajos de glutatión (GSH) en el cerebro, que juega un papel de antioxidante endógeno en la eliminación de EROS. 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 NADPH oxidasas o las xantina oxidasas), 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, existen varios mecanismos patológicos que provocan un aumento del estrés oxidativo, como la activación de las oxidasas NADPH por los péptidos A $\beta$ , con la consiguiente producción de radicales libres por parte de esta enzima (Van Bulck y col., 2019), además en cerebros de pacientes con EA, se ha observado un aumento de la expresión de enzimas que catalizan la generación de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, como las óxido nítrico sintasas y las NADPH oxidasas (Manolopoulos y col., 2010).

#### **4.8 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

glutati6nperoxidasa (GPX) (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus c6lulas) y ex6genos, como vitamina C, vitamina E y betacarotenos (ingresan a trav6s de la dieta) (MedlinePlus 2021).

#### **4.9 Tratamiento farmacol6gico de la EA**

Si bien en la actualidad no hay cura para la EA, existen f6rmacos los cuales pueden ayudar a controlar o retrasar la progresi6n de esta, sin embargo, estos f6rmacos generan efectos secundarios que perjudican la calidad de vida de los pacientes (Brightfocus, 2017), estos medicamentos comparten los siguientes efectos secundarios, dolor de cabeza, confusi6n, cambios en la visi6n, mareos, n6useas, dificultad para caminar o p6rdida de equilibrio, convulsiones, entre otros (MedlinePlus., 2023), cabe mencionar que estos medicamentos en particular Lecanemab solo reduce un 27% la progresi6n de la EA (Fundaci6n Pascual Maragall., 2023).

#### **4.10 Tratamientos farmacol6gicos para tratar las enfermedades neurodegenerativas**

Si bien en la actualidad no hay cura para la EN, existen f6rmacos los cuales pueden ayudar a controlar o retrasar la progresi6n de esta. Algunos tratamientos ayudan a controlar la agitaci6n, la presi6n o los s6ntomas psic6ticos (alucinaciones o delirios) que pueden ocurrir cuando la enfermedad progresa; sin embargo, estos f6rmacos 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 degradaci6n de la acetilcolina (Exelon®, Aricept®) Por mencionar algunos, los cuales comparten los siguientes efectos secundarios, n6useas, p6rdida de peso, dificultad para dormir y dolores de cabeza entre otros (Brightfocus, 2017).

##### 2.6.1 Tratamientos farmacol6gicos para tratar la enfermedad de Parkinson y sus desventajas

F6rmacos com6nmente empleados para controlar o retrasar la progresi6n 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 sigue investigando y buscando alternativas naturales no farmacológicas, las cuales ayuden a retrasar la progresión de las EN, sin que desencadenen efectos secundarios como los ya antes mencionados.

#### **4.11 Tratamientos alternativos no farmacológicos para las EN**

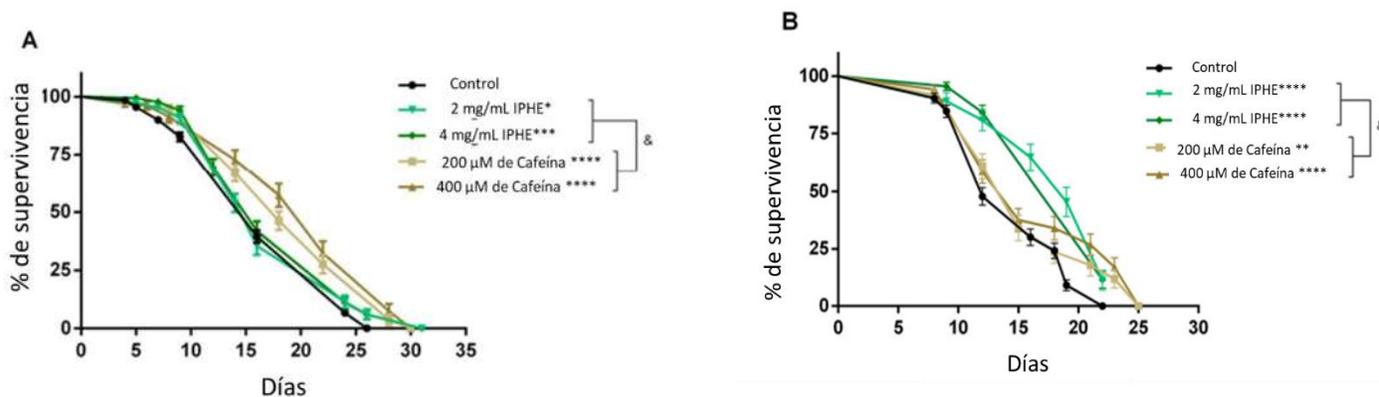
Hasta ahora, los esfuerzos para encontrar una cura para las EN han sido deficientes, y los medicamentos actualmente disponibles para tratar la enfermedad tienen una efectividad limitada, especialmente si la enfermedad se encuentra en su etapa moderada o grave. Los pacientes en la etapa grave tardía de la EN requerirán atención integral.

#### **4.12 Alimentos funcionales**

Un alimento funcional es aquel que, además de su valor nutritivo, contiene componentes biológicamente activos que aportan algún efecto añadido y beneficioso para la salud y reducen el riesgo de contraer ciertas enfermedades. Desde el punto de vista práctico, esto quiere decir que los alimentos funcionales pueden ser naturales, o bien aquellos a los que se ha añadido, incrementado su contenido o eliminado algún componente, o bien a los que se ha modificado la naturaleza o biodisponibilidad de alguno de sus componentes. Los alimentos funcionales presentan diversas características estos deben presentarse en forma de alimentos de consumo cotidiano, su consumo no debe producir efectos nocivos, además de disminuir y/o prevenir el riesgo de contraer enfermedades, por mencionar algunas.

Las plantas medicinales y los remedios a base de hierbas ahora están ganando más interés como intervenciones terapéuticas complementarias y alternativas, son una fuente valiosa para desarrollar fármacos candidatos para las EN. Diversos estudios han descrito el uso de diversas plantas medicinales y sus principales fitoquímicos para el tratamiento de la EA (Gregory J. y col. 2021).

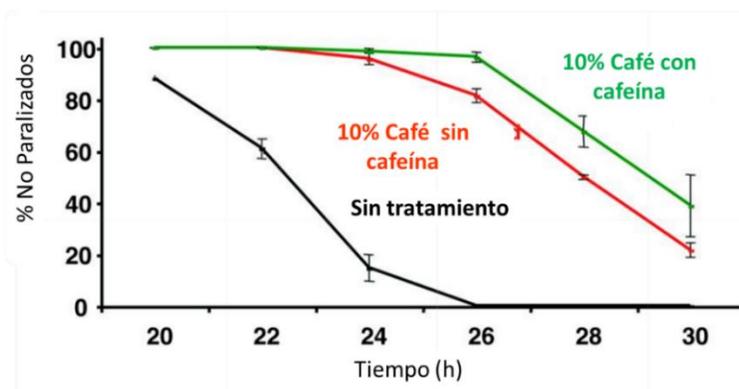
Machado y col. en 2019 evaluaron el extracto hidroalcohólico de *Ilex paraguariensis* (IPHE) mejor conocido como Yerba mate, en el modelo biológico de *Caenorhabditis elegans*, en las cepas N2WT y CL2006, donde encontraron que este extracto aumenta resistencia contra el estrés oxidativo y promueve la protección contra la toxicidad inducida por el péptido beta amiloide, este extracto lo compararon con la cafeína la cual ha sido ampliamente reportada como protectora y estimulante del sistema nervioso central, en donde encontraron que IPHE y cafeína redujeron eficazmente los niveles intracelulares de EROS en *C. elegans* en condiciones normales y de estrés. El potencial de IPHE y cafeína para regular el estado redox de *C. elegans* se correlacionó positivamente con una mayor resistencia al estrés y longevidad en los animales de tipo silvestre (N2WT).



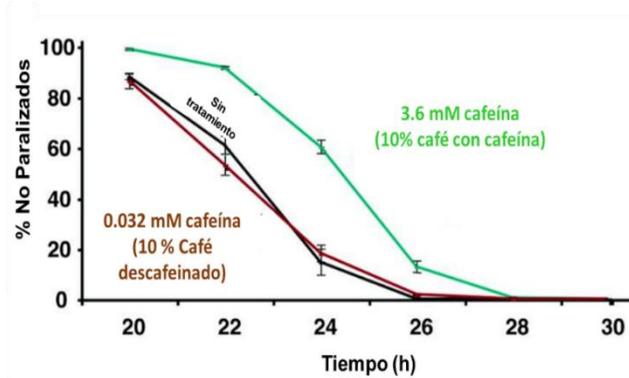
**Figura 2:** A y B Curvas de supervivencia de (A) Cepa N2WT tipo silvestre, (B) Cepa mutante CL2006. Los datos se expresan como porcentaje del control. Los experimentos se realizaron cuatro veces en días diferentes, por triplicado. \*p = 0,0352, \*\*p = 0,0421, \*\*\*p = 0,0002, \*\*\*\*p < 0,0001 en comparación con el control respectivo no tratado y & p < 0,0140 en comparación con el tratamiento con IPHE y cafeína mediante la prueba de rango largo (Mantel-Cox).

Por otro lado, Dostal y col., en 2010 realizaron un ensayo con extractos de café, empleando cepas transgénicas del modelo biológico *C. elegans*, las cuales expresan el péptido A $\beta$ -42. En donde emplearon el método de prensa francesa para la extracción del café. Los granos de café (Starbucks House Blend, con cafeína o descafeinado) los molieron durante 3 min en un molinillo de café estándar y después los hirvieron en una suspensión de 18,4 % (p/v) en agua desionizada durante 30 min. Los extractos los esterilizaron por filtración pasándolos a través de una unidad de filtro Fast PES de Nalgene, una membrana de 75 mm de diámetro (tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m), y los almacenaron a 2° C.

Seguido de este ensayo decidieron probar la concentración de cafeína que se reporta en el café, pero ahora de manera pura en donde encontraron lo siguiente:



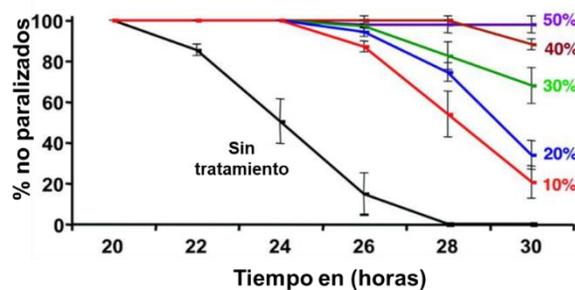
**Figura 3:** La incorporación de extracto de café con cafeína o descafeinado al 10 % en placas con medio de agar suprime la parálisis (control frente a café con cafeína o descafeinado,  $P < 0,001$ ; café descafeinado frente a café con cafeína,  $P < 0,002$ ).



**Figura 4:** la incorporación de cafeína pura en placas de medios de agar también puede retrasar la parálisis inducida, pero este efecto es más débil que el del café descafeinado.

Posterior a esto realizaron una cinética de parálisis en donde muestran los siguientes resultados.

**Figura 5:** Curvas de parálisis de respuesta a la dosis para medios de agar que contienen 0–50% de



extracto de café. Barras de error = SEM.

Con estos resultados se puede concluir que el café retrasa la parálisis inducida en el nematodo de *C.elegans*

Si bien ya existen ensayos reportados con extractos café y el modelo biológico *C. elegans*, cabe resaltar que en sus ensayos solo utilizan un tipo de tostado de café, así como también un método de extracción en específico, en donde no toman en cuenta el tipo de tostado del café, así como también la temperatura del agua para la extracción de los compuestos bioactivos del café, cabe señalar que el tipo de tostado, así como la temperatura influyen en la extracción de estos compuestos bioactivos.

#### 4.13 El café como alimento funcional

Una alternativa natural para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas 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).

##### 4.13.1 Composición química del café

Entre la composición química del café (tabla 1), destacan los siguientes compuestos químicos (Puerta., 2011); Número de compuestos químicos identificados en el café (tabla 2) (Gottleland 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 1:** 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 2:** número de compuestos químicos identificados en el café.

#### 4.13.2 Contenido de ácidos clorogénicos en el café

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. 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 (Gottleland y de Pablo, 2007).

#### 4.13.3 Contenido de cafeína en el café

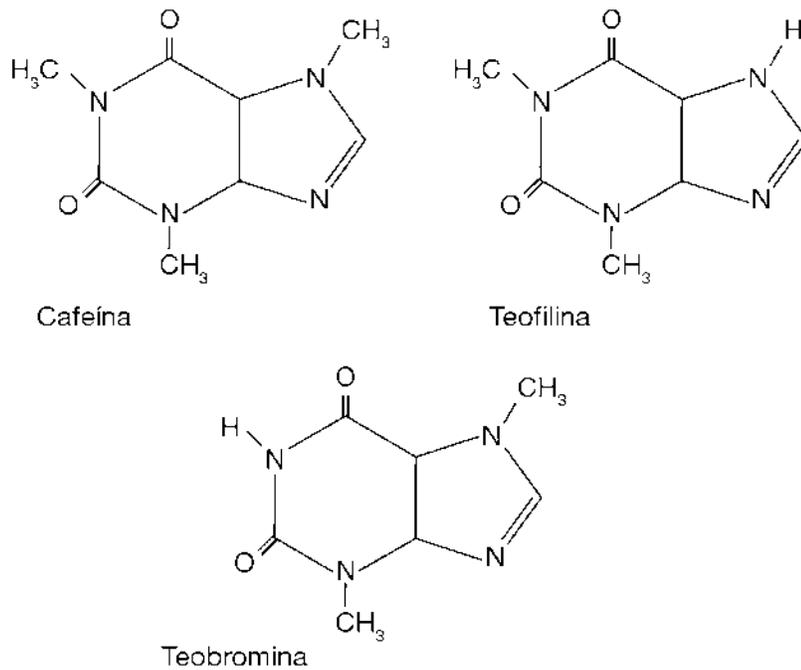
El café es el producto que contiene la cantidad más alta y variable de cafeína en la dieta (0.8-1.8%). La dosis de cafeína del café depende de las diferencias genéticas de los granos, así como del tiempo y la forma de preparación (ver tabla 4), oscilan entre 30 y 175 mg por 150 ml. El café descafeinado contiene entre 2 y 8 mg por 150 ml (Pardo y col., 2007).

La dieta juega un papel importante en la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidante, fundamentalmente a través del aporte de compuestos bioactivos de origen vegetal, lo que está llevando a las industrias alimentarias a diseñar alimentos funcionales que supongan un aporte extra de antioxidantes naturales (García., 2005).

Para el estudio de la actividad antioxidante de extractos vegetales y su efecto protector ante un estrés oxidante se han utilizado diversos organismos, tales como, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Bauer y col., 2004), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Cheng y col., 2014) y ratas (Peña-Montes., 2019).

#### 4.14 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 6:** estructura química de las metilxantinas

#### 4.15 *Caenorhabditis elegans* como modelo biológico en el estudio de EN

El nematodo *C. elegans* ha demostrado ser un modelo de estudio adecuado, en el estudio de varios procesos biológicos, incluyendo el desarrollo, el envejecimiento y una serie de condiciones patológicas (Brenner, 1974; Kenyon y col., 1993; Rodríguez y col. 2013., Felix y Barkoulas, 2012; Antoshechkin y Sternberg, 2007). *C. elegans* ofrece varias ventajas experimentales incluyendo el bajo costo, el mantenimiento directo, la capacidad de escala y su transparencia, que permite la microscopia. Además, tienen un ciclo de vida corto ( $\pm 25$  días a  $20^\circ\text{C}$ ) (Figura 7) que es una ventaja clave en los estudios de envejecimiento. Además, se pueden distinguir muchos tipos de células diferentes en *C. elegans*, incluyendo neuronas, células musculares, intestino y células excretoras (Antoshechkin y Sternberg, 2007) que han sido bien caracterizadas.

Otra característica ventajosa de este organismo es la disponibilidad de un mapa genético detallado y su genoma completamente secuenciado (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Debido a su corta vida útil y la posibilidad de manipulación genética, los modelos de *C. elegans* que imitan la enfermedad humana se han utilizado ampliamente para estudiar el mecanismo de la enfermedad y para detectar posibles fármacos. Dado que los nutraceuticos con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobiano, a menudo tienen el potencial de retrasar la aparición de la EN, nos preguntamos si los compuestos bioactivos del café podría retrasar el comportamiento patológico inducido en *C. elegans* (Markaki y Tavernarakis, 2010).

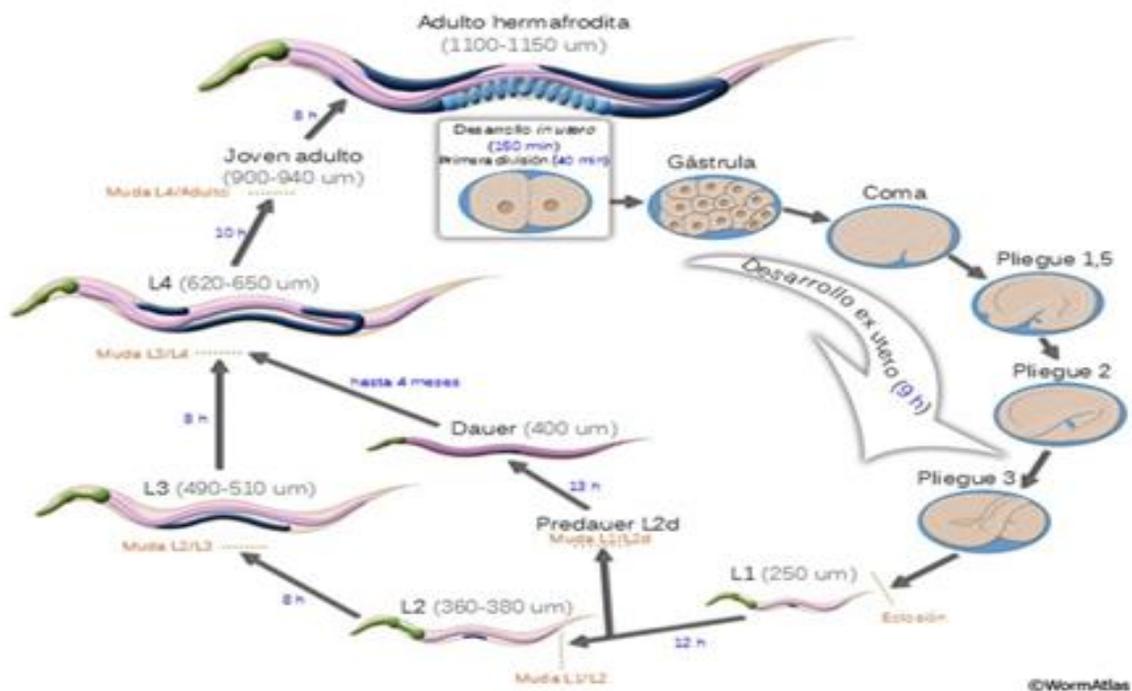


Figura 7: Ciclo de vida de *C. elegans* a 25° C.

#### 4.16 La glucosa como agente oxidante para inducir la producción de EROS en *C. elegans*

Se sabe que las dietas con alto contenido de glucosa generan especies reactivas de oxígeno (EROS), que incluyen especies de oxígeno radicales y no radicales como el radical hidroxilo (HO) anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que puede dañar los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y podría conducir a la muerte celular (Ray y col., 2012).

En este contexto, se ha sugerido que el estrés oxidante es un factor relacionado con el desarrollo de diversas enfermedades, como la obesidad y la diabetes (Bonomini y col., 2015; Yu y col., 2016), esto se debe que al tratar de metabolizar la glucosa que entra a la célula, esta pasa por los procesos de glucólisis y ciclo de Krebs hasta llegar a la cadena respiratoria en la mitocondria donde se genera la mayor cantidad de radicales libres (Huo y col., 2016). Además, *Caenorhabditis elegans* se ha utilizado en estudios de toxicidad inducida por glucosa (Mondoux y col., 2011; Choi y col., 2011; Schlotterer y col., 2009), estos informes han documentado que concentraciones altas de glucosa afecta el crecimiento, la fertilidad, el envejecimiento y la esperanza de vida.

Es importante mencionar que debido al incremento de la entrada de glucosa, la célula tiene ahora una presión metabólica inducida por alta concentración de sustrato para alimentar en exceso a la cadena respiratoria pero sin un incremento correspondiente y proporcional en la necesidad de ATP en la célula, lo que hace que el potencial protonmotriz se acumule en exceso y la cadena respiratoria pueda generar más  $O_2^-$  que en condiciones de óptimo acople entre la formación de ATP y la función de la cadena respiratoria (Calderón y col., 2003).

No obstante, estos estudios se han realizado bajo una amplia gama de condiciones experimentales, es decir, diferentes concentraciones de glucosa utilizadas, diversos regímenes de administración y tiempos de exposición variados, lo que hace difícil comparar los resultados obtenidos.

#### **4.17 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 EROS, 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  $\alpha$ -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).

#### **4.17.1 Moléculas de bajo peso molecular**

##### **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 peroxidasa (GPx), glutatión S-transferasas (GST) y glutatión reductasa (GR) (Halliwell, 1996; Rossi y col., 2002). El glutatión es fundamental en procesos de detoxificación celular y la relación entre glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) contribuye al estatus redox de la célula.

### **Glutatión 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 estrés oxidativo (Benner y col., 2011). El término glutatión peroxidasa (GPx) se asocia a una familia de múltiples isoenzimas (GPx1–8) que cataliza la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua utilizan glutatión 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).

### **Proteínas y enzimas antioxidantes**

Está claro que un exceso de ROS contribuye a producir daños a diferentes niveles, por lo que el organismo cuenta con mecanismos de defensa antioxidante endógenos, principalmente proteínas y enzimas, para eliminar el exceso de EROS producidas (Ďuračková, 2014).

### **Superóxido dismutasa (SOD)**

La cadena transportadora de electrones favorece la producción principalmente de radical superóxido. La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que posteriormente puede ser transformado a agua por la acción de otras enzimas como catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y/o peroxirredoxinas (Prxs) (Fridovich, 1995). En *C. elegans*, cinco genes codifican a la Superóxido dismutasa: sod-1 a sod-5. SOD-1, SOD-4 y SOD-5 son SOD las cuales realizan unión al ión Cobre y Zinc (Cu / Zn), mientras que SOD-2 y SOD-3 son SOD que realizan actividad de unión al ión de Manganeseo (Mn) (Jensen y Culotta, 2005; Yang y col., 2007; Doonan y col., 2008). SOD-1 en sí mismo contribuye con casi el 80% de la expresión total de ARNm de sod, así 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 superóxido y peróxido se distribuye en cinco SODs

diferentes con diferentes propiedades, distribuciones subcelulares y 28 posiblemente distribuciones tisulares hace que *C. elegans* sea un modelo particularmente bueno para explorar la variedad de roles biológicos de las SODs.

### **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.

#### **4.17.2 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 (PKD-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) (figura 8) también es capaz de fosforilar DAF-16 / FOXO (Altintas y col., 2016).

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., 29 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).

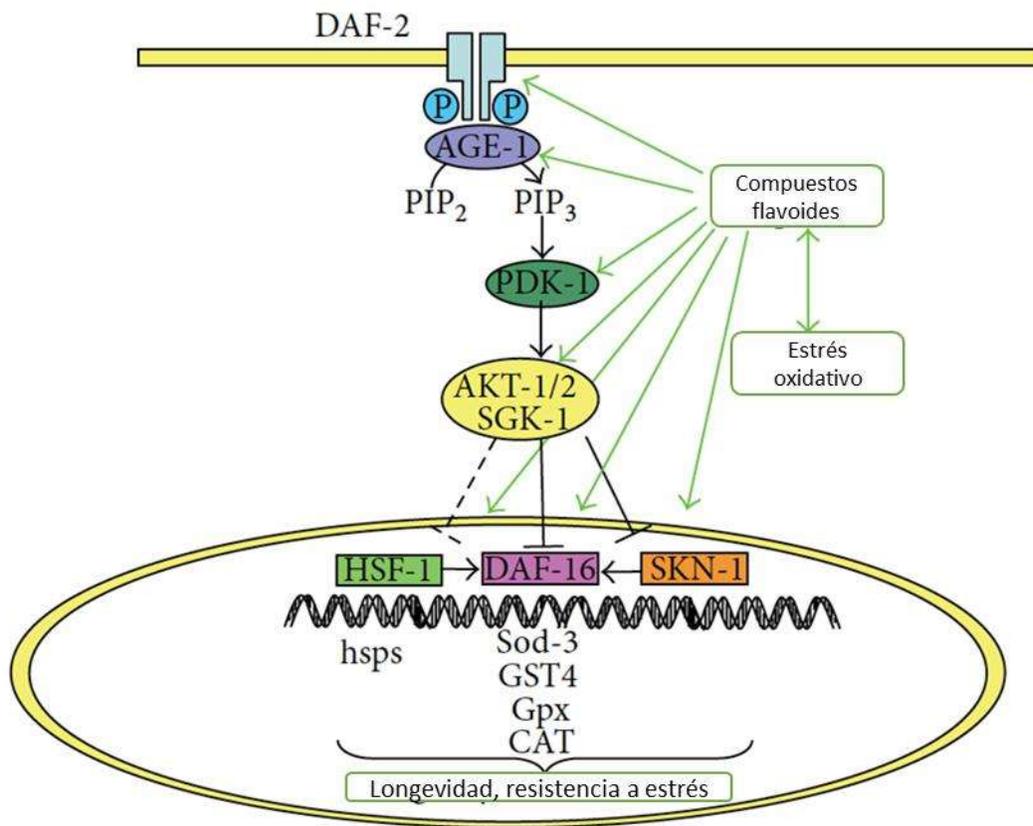
Adachi y col., 1998 demostraron que los nematodos con una mutación en el gen *age-1* tenían una menor concentración de proteínas carboniladas y que los niveles de éstas no aumentaban con la edad, en comparación con lo que ocurría en la cepa silvestre. Los mutantes *age-1* no sólo eran resistentes a estrés 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 (Barsyte 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 ácidos clorogénicos, los cuales actúan como antioxidantes indirectos.

Pietsch y colaboradores en el 2009, demostraron que el aumento en la esperanza de vida por una exposición con quercetina es independiente del factor transcripcional DAF-16/FOXO en *C. elegans*, pero si es dependiente del receptor *daf-2* y de *age-1*, contrario al efecto que se había reportado previamente, en donde la quercetina aumentó la vida útil mediado por la acción DAF-16 (Henderson y Johnson, 2001; Murphy et al., 2003).

En este mismo contexto, Büchter y col., 2013 informaron que para la mejora de la vida útil en *C. elegans*, la miricetina requiere la presencia de DAF-16, ya que se observó una mayor traslocación de DAF-16 al núcleo, sobreexpresando la Superóxido dismutasa mitocondrial (*sod-3*).

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), donde activan un conjunto de genes que median el estrés oxidante, DAF-2 es ortólogo al receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) y AGE-1 es un ortólogo de la PIK3 humana (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa) (Guzmán-A.,2019).



**Figura 8:** Vía de señalización de la insulina en *C. elegans*. Esquema simplificado de la IIS-IGF-1. (Koch y col., 2014)

## V. Justificación

Las enfermedades neurodegenerativas aún no tienen cura, 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 inhibiendo o retardando el proceso de oxidación de las biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN, lo cual genera daño a las células nerviosas, además se ha demostrado que una ingesta moderada de café reduce la agregación de la proteínas específicas de las EN en el cerebro, el cual es una característica patológica de las mismas. Por otro lado, se han desarrollado nuevas estrategias para estudiar la conducta y aprendizaje en el nematodo de *C. elegans*, por lo cual al conjuntar estas técnicas bioquímicas-moleculares y conductuales nos permitirán elucidar de una mejor forma el papel de los compuestos bioactivos del café en la prevención de las EN.

## **VI. Hipótesis**

El café tostado oscuro por infusión previene la neurodegeneración en modelos de *C. elegans*

## **VII. Objetivos**

### **7.1 Objetivo general**

Evaluar la capacidad de la infusión del café tostado oscuro en la prevención de las EN en *Caenorhabditis elegans*

### **7.2 Objetivos particulares**

- 1.-Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de las infusiones de café en *Caenorhabditis elegans*
- 2.- Evaluar el efecto de la infusión de café oscuro en la memoria y aprendizaje de *C. elegans*
- 3.- Determinar el índice de memoria y aprendizaje en modelos de hiperglucemia de *C. elegans*

## VIII. Materiales y Métodos

### 8.1 Material biológico.

Se utilizaron granos de café (*Coffea arabica*) de distinto tipo de tostado, entre los cuales se encuentran: 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®.

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

- N2 Silvestre Bristol
- **Cepas mutantes**
- CF1038 *daf-16* (*mu86*),
- MQ1766 *sod-2* (*ok1030*) I; *sod-5* (*tm1146*) *sod-1* (*tm783*) II; *sod-4* (*gk101*) III; *sod-3* (*tm760*) X,
- TJ401 *age-1* (*hx546*),

Para el mantenimiento de las cepas, los nematodos se cultivaron en placas NGM sembradas con *Escherichia coli* OP50, e incubadas a 12°C. En los ensayos, los nematodos se cultivaron en placas NGM sembradas con *E.coli* OP50 incubando a 18°C, excepto la cepa TJ401 *age-1* (*hx546*) que fue incubada a 15°C. Los nematodos se sincronizaron 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 una solución buffer M9 (NaCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> 1M). Después de la sincronización, los nematodos se sembraron en una placa NGM (condición control), en placas suplementadas con glucosa, infusión de café o una mezcla de glucosa e infusión de café y se alimentaron con *E. coli* OP50 hasta que alcanzaron la etapa larvaria L4. Se añadió glucosa a la mezcla de agar y sales del medio NGM para obtener una concentración de 60 mM y 80 mM y una concentración de compuestos fenólicos de 30 µg/mL,

## **8.2 Preparación de las infusiones de café**

La extracción de los compuestos del café se realizó por el método convencional de 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 (no 10). El extracto recuperado fue almacenado a 4°C en viales color ámbar hasta su uso.

## **8.3 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. Las muestras 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, se añadieron 40 µL de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 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).

## **8.4 Cuantificación de cafeína**

La cuantificación de cafeína se realizó por medio de cromatografía líquida (HPLC). La muestra (infusión) se preparó de acuerdo al apartado 6.2. y el contenido de cafeína en ésta se calculó mediante una curva de cafeína pura. Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes, columna C18 150 x 4.6 mm, temperatura de la columna: 30°C, flujo 0.8 mL/min, absorbancia 272-275 nm, inyección 20 µL, tiempo de corrida 25 min, fase móvil 0.1% ácido fosfórico/ acetonitrilo (80/20) elución isocrática (Virgen-Ortiz., 2020).

## **8.5 Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro***

Para determinar la potencia antioxidante las muestras se normalizaron a una concentración de 10 µg/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 (Guzmán-Hernández., 2019).

### **8.5.1 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 µL de la muestra normalizada y se adicionaron 140 µL del radical DPPH-, se incubó 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).

### **8.5.2 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 incubó 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).

### 8.5.3 Método FRAP

Este es un ensayo colorimétrico que mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el complejo Fe (III)- Tripiridiltriazina férrica a su forma ferrosa, cambiando así su absorbancia, el ensayo 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  $\mu$ L de muestra normalizada y 190  $\mu$ L de la solución preparada anteriormente, se incubó 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).

### 8.6 Sincronización de *Caenorhabditis elegans*

La sincronización de *C. 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 incubaron durante 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 vigorosamente durante 4 minutos y se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto y se lavaron tres veces con buffer M9. 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, los nematodos se pasaron a placas nuevas de NGM con alimento.

### 8.7 Ensayo de resistencia a estrés oxidante en *C. elegans*

Se utilizó glucosa como un agente para inducir estrés oxidante en los nematodos, dado que ha sido reportado que altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo inducen la generación de especies reactivas de oxígenos en los nematodos provocado por el alto flujo de electrones en

la mitocondria derivado de la oxidación catabólica de la glucosa. Los nematodos L1 sincronizados se convirtieron en adultos jóvenes en NGM, luego se transfirieron 20 nematodos en diferentes medios suplementados con glucosa (0 , 60mM y 80 mM), 30 µg/mL de fenoles totales y la mezcla que contenía glucosa y fenoles, ambos con las mismas concentraciones dichas anteriormente. El porcentaje de sobrevivencia de población de los nematodos fue evaluado a los 5 y 10 días en donde se estuvieron tomando fotografías para medir a los nematodos por medio del software imageJ.

## **8.8 Ensayo de quimiotaxis**

### **8.8.1 Ensayo de dosis efectiva 50 DE50**

La dosis efectiva 50 se determinó adicionando distintas concentraciones de alcohol isoamilico el cual funcionará como un atrayente en los ensayos de quimiotaxis, se probarán concentraciones de 1M hasta 1 pico molar, en donde se elegirá la concentración a la cual la mitad de la población responda al estímulo de atracción, (quimiotaxis) posterior a esto se estarán realizando los ensayos de quimiotaxis con esta concentración.

Se sincronizarán los nematodos de las cepas: N2WT, CF1038, TJ401 y MQ1766 de acuerdo a (Shapira y col. 2008) con ligeras modificaciones y se incubaran en cajas de medio NGM, suplementadas con E. coli OP50 a 18°C durante 72h hasta que alcancen la etapa larvaria L4, posteriormente se pasaran 50 nematodos a placas de medio NGM, suplementadas con E. coli OP50 e infusiones de café, previamente normalizadas a 10 µg/mL y posteriormente se le agregaran 10µL de odorante (alcohol isoamilico) en la tapa para generar un estímulo de asociación de alimento con olor del odorante se dejaran los nematodos 90 minutos en presencia del odorante en la tapa, posterior a esto se van a transferir los gusanos a una placa de NGM, sin alimento y sin odorante durante 90 minutos, pasado este tiempo, se transferirán los nematodos a un tubo cónico con 500 µL de medio liquido M9 en donde se llevaran a la centrifuga durante 5s a 100 rpm dos veces, para después llevar a la placa de prueba de quimiotaxis, en donde se

colocaran 10 µL de odorante (alcohol isoamilico) a la mancha “atrayente”. En el lado opuesto del punto atrayente, se añadirá 10 µL de odorante de control (100% de etanol) de inmediato, se agregarán los nematodos (aproximadamente 50) al centro de la placa. Finalmente, se incubarán las placas de ensayo a 18°C durante 90 min y posteriormente se contará el número de nematodos en cada cuadrante y se calculará mediante la siguiente ecuación.

$$IQ = (A - B) / (A + B)$$

Ecuación para la determinación del índice de quimiotaxis, en donde: IQ= índice de quimiotaxis, A= atrayente, B= repelente

## 8.9 Análisis estadístico

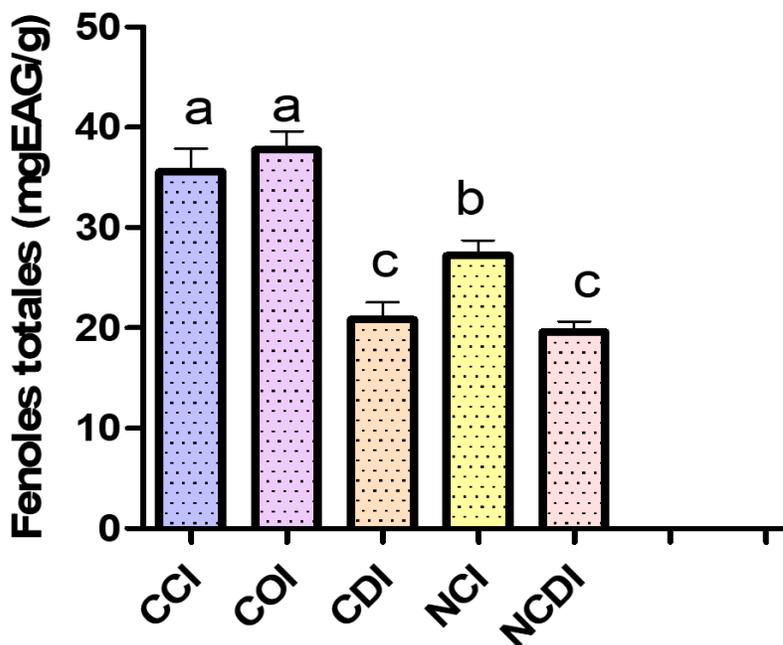
Los análisis estadísticos se realizaron mediante la prueba t de Student. Todos los cálculos se realizaron utilizando Microsoft Office Excel 2019 versión 16.2. Los experimentos se realizaron por triplicado y los ensayos de esperanza de vida por sextuplicado. Los valores de p inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Los datos experimentales se muestran como el promedio ± s.d. de al menos tres experimentos independientes. Los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 7.0.

## IX. Resultados

### 9.1 Contenido de compuestos fenólicos totales en el café

En la presente propuesta de investigación se plantea que el café oscuro tiene una mejor capacidad de neuroprotección en comparación a otras presentaciones de café, debido principalmente al mayor contenido de fenoles y cafeína, por lo que en primer lugar se determinó el contenido de estos metabolitos, contrastado diferentes presentaciones de café gourmet e industrial. Se observó que las infusiones de café gourmet tostado claro y oscuro, poseen la mayor cantidad de fenoles totales en comparación al resto de las presentaciones evaluadas, con un promedio de 38 mg EAG/g. En segundo lugar, se registró el café industrial clásico con un

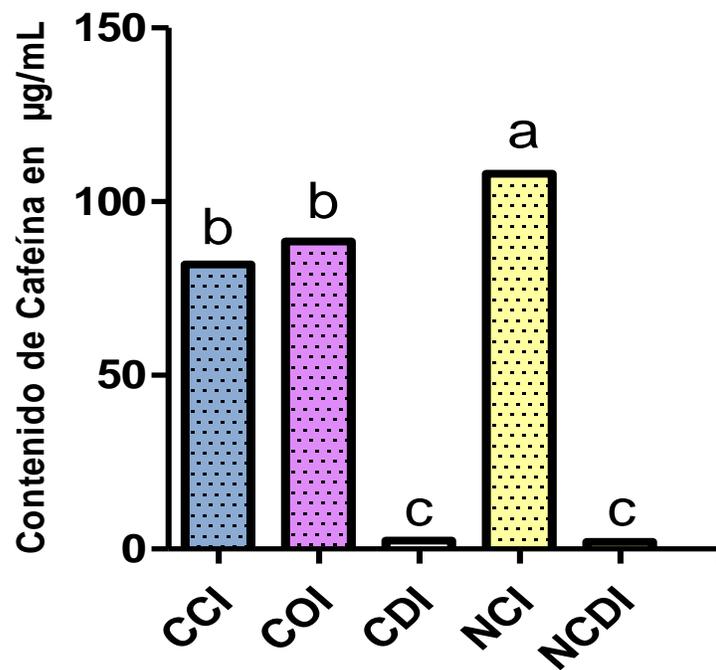
contenido de fenoles totales de 28 mg EAG/g, siendo este valor, estadísticamente diferente al valor registrado en los cafés gourmet. Interesantemente, se observó que la descafeinización redujo el contenido de fenoles totales tanto en el café gourmet como en el industrial, registrándose un valor promedio de 9 mg EAG/g, mostrando una diferencia significativa (figura 9).



**Figura 9:** Contenido de fenoles totales en infusiones de diferentes presentaciones de café. (n=3; Tukey;  $\alpha=0.05$ ,  $\pm$  desviación estándar), **CCI:** Café tostado claro, **COI:** Café tostado oscuro, **CDI:** Café tostado oscuro sin cafeína, **NCI:** Café claro industrial, **NCDI:** Café claro industrial sin cafeína.

## 9.2 Contenido de cafeína de las infusiones de café

Se determinó el contenido de cafeína en las diferentes infusiones, como se puede observar en la Figura 10, el mayor contenido de cafeína se registró en el café industrial clásico con 112  $\mu\text{g/mL}$ ; en segundo lugar se registraron los cafés gourmet tostado claro y oscuro, con un contenido de 85  $\mu\text{g/mL}$  de cafeína en promedio entre los dos. Como era de esperar los cafés descafeinados, gourmet e industrial, mostraron niveles trazas de cafeína, con un promedio de 2.7  $\mu\text{g/mL}$ .



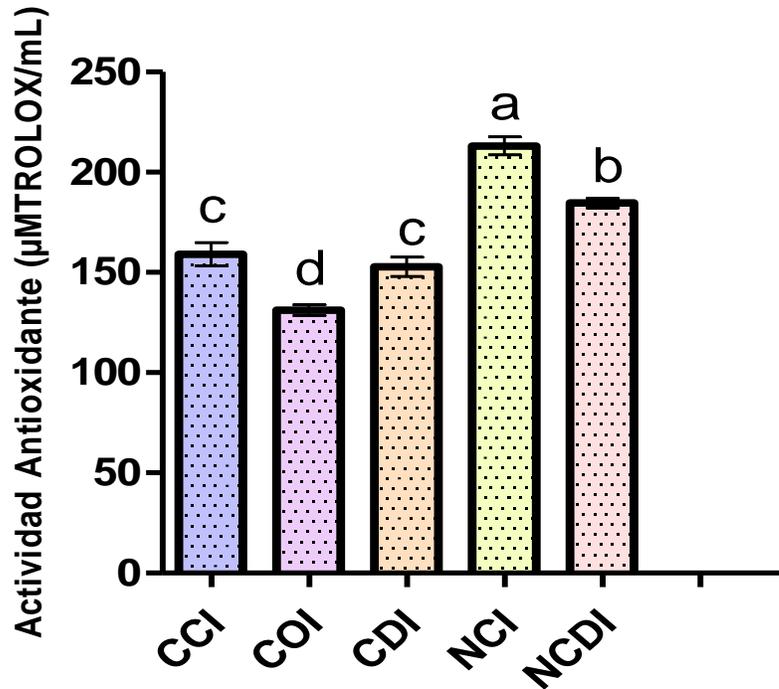
**Figura 10:** determinación del contenido de cafeína por HPLC, las barras de error representan la desviación estándar, Tukey, letras diferentes denotan diferencia significativa. El experimento se realizó por triplicado, **CCI:** Café tostado claro, **COI:** Café tostado oscuro, **CDI:** Café tostado oscuro sin cafeína, **NCI:** Café claro industrial, **NCDI:** Café claro industrial sin cafeína.

Una vez determinado el contenido de estos principales tipos de metabolitos, el siguiente paso fue evaluar el potencial antioxidante *in vitro*, para lo cual, como se describió en la metodología, los extractos fueron normalizados a una concentración de 10 µg/mL , con la finalidad de evaluar las posibles diferencias en capacidad antioxidante, lo cual deberá ser un reflejo de las diferencias en el perfil de metabolitos entre las muestras, no un de la concentración total de fenoles en las infusiones.

### **9.3 Actividad antioxidante *in vitro***

#### **Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* mediante la prueba de DPPH-**

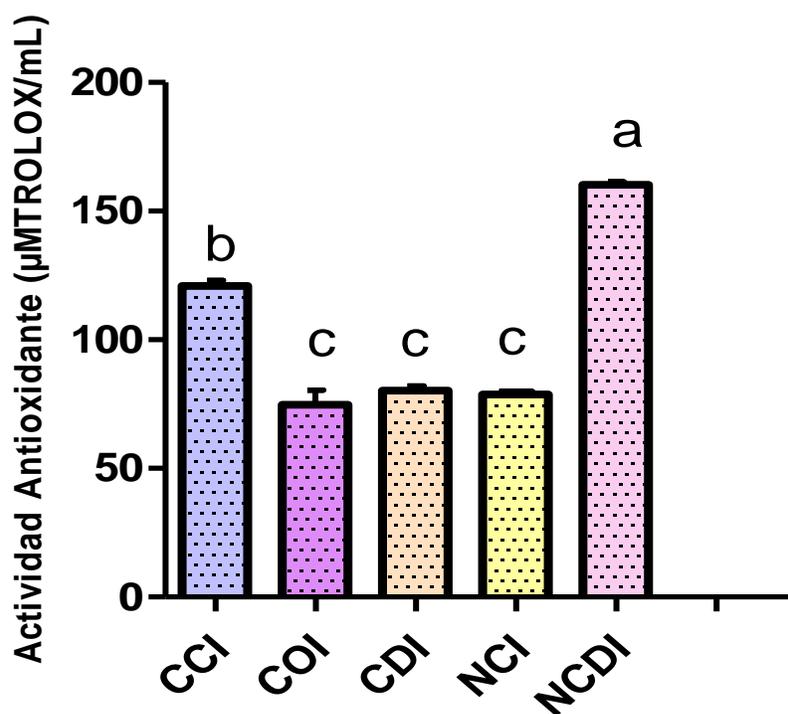
La capacidad de eliminación del radical DPPH- por las infusiones de café gourmet e industrial se presentan en la figura 11. El café industrial con cafeína mostró la mayor capacidad para la eliminación de este radical con 213 µM TROLOX/mL, siendo estadísticamente superior al resto de las infusiones. El café industrial descafeinado registro el segundo mayor valor, con una actividad equivalente a 183 µM TROLOX/mL; las infusiones de los cafés gourmet claro y descafeinado, presentaron la misma actividad, estadísticamente hablando, con un promedio de 154 µM TROLOX/mL. El café oscuro, presentó la menor actividad antioxidante, con un valor de 137 µM TROLOX/mL.



**Figura 11:** Actividad antioxidante in vitro mediante la prueba de DPPH-: Tukey;  $\alpha=0.05$  letras diferentes denotan diferencia significativa; las barras de error representan la desviación estándar (SD), el experimento se realizó por triplicado. **CCI:** Café tostado claro, **COI:** Café tostado oscuro, **CDI:** Café tostado oscuro sin cafeína, **NCI:** Café claro industrial, **NCDI:** Café claro industrial sin cafeína.

#### Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* mediante la prueba de ABTS+

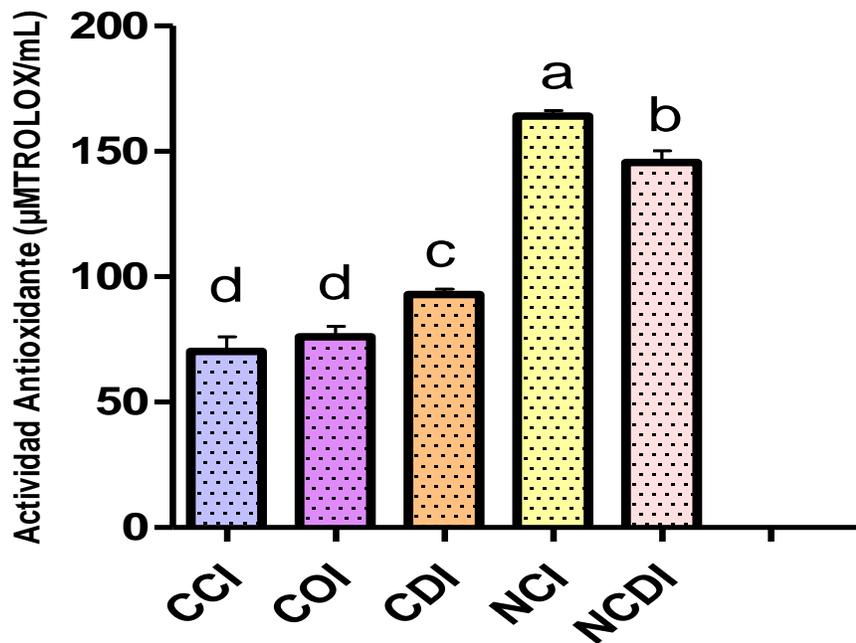
La capacidad de eliminación del radical libre ABTS<sup>+</sup> por las infusiones de café gourmet e industrial se presentan en la figura 12. El café soluble descafeinado industrial fue el que presentó una mayor capacidad de eliminación de este radical con 161 µM TROLOX/mL, siendo estadísticamente superior al resto de las infusiones. La infusión del café gourmet tostado claro registró la segunda mayor actividad con un valor de 120 µM TROLOX/mL. Las tres infusiones restantes, café oscuro, y los dos descafeinados, presentaron un valor estadísticamente similar entre ellos, con un promedio de 70 µM TROLOX/mL, .



**Figura 12:** Actividad antioxidante *in vitro* radical ABTS•+ (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), las barras de error representan la desviación estándar (SD). **CCI:** Café tostado claro, **COI:** Café tostado oscuro, **CDI:** Café tostado oscuro sin cafeína, **NCI:** Café claro industrial, **NCDI:** Café claro industrial sin cafeína.

### **Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de las infusiones de café gourmet e industrial, mediante la prueba de FRAP**

Para el ensayo de FRAP (figura 13), el café industrial registró una mayor capacidad para reducir el hierro férrico a su forma ferrosa, con un valor de valores de 164 µM Trolox/mL, seguido del café industrial descafeinado, con una actividad de 148.5 µM Trolox/mL. En tercer lugar, se registró la infusión de café gourmet descafeinado con una actividad de 85 µM Trolox/mL. La menor actividad se observó en las infusiones de los cafés gourmet claro y oscuro, sido estadísticamente similares, con una actividad promedio de 73 µM Trolox/mL.

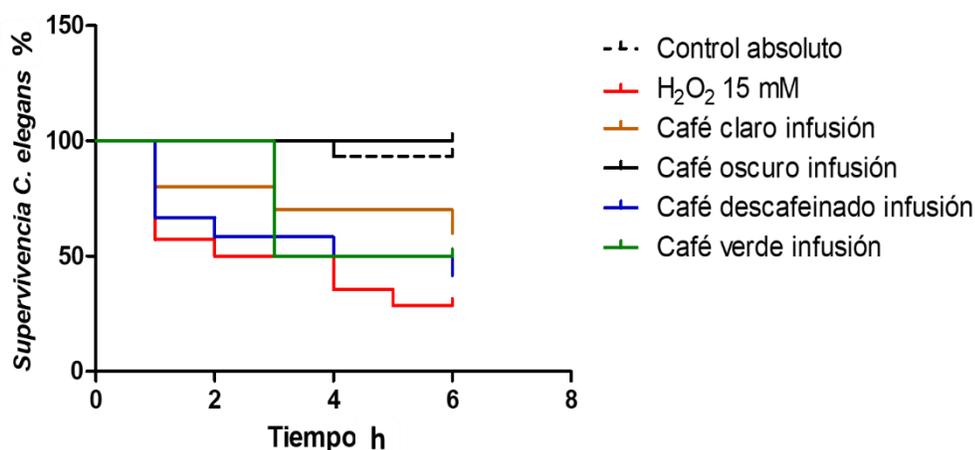


**Figura 13:** Actividad antioxidante *in vitro*, reductora de hierro, del complejo Fe (III)-Tripiridiltriazina férrica a su forma ferrosa FRAP, las barras de error representan la desviación estándar. El ensayo se realizó por triplicado. **CCI:** Café tostado claro, **COI:** Café tostado oscuro, **CDI:** Café tostado oscuro sin cafeína, **NCI:** Café claro industrial, **NCDI:** Café claro industrial sin cafeína

De acuerdo a los ensayos de actividad antioxidante *in vitro*, se puede establecer que la mayor potencia antioxidante lo presentan las infusiones de los cafés industriales, en sus variantes clásico y descafeinado. Para evaluar esta actividad antioxidante *in vivo*, se preconditionaron los nematodos por 48 horas en un medio de cultivo líquido (M9) suplementados con 100 µg/mL de fenoles totales de cada una de las suspensiones, para ser expuestos posteriormente a una solución 15 mM de peróxido de hidrógeno por 6 horas.

## 9.4 Actividad antioxidante *in vivo*

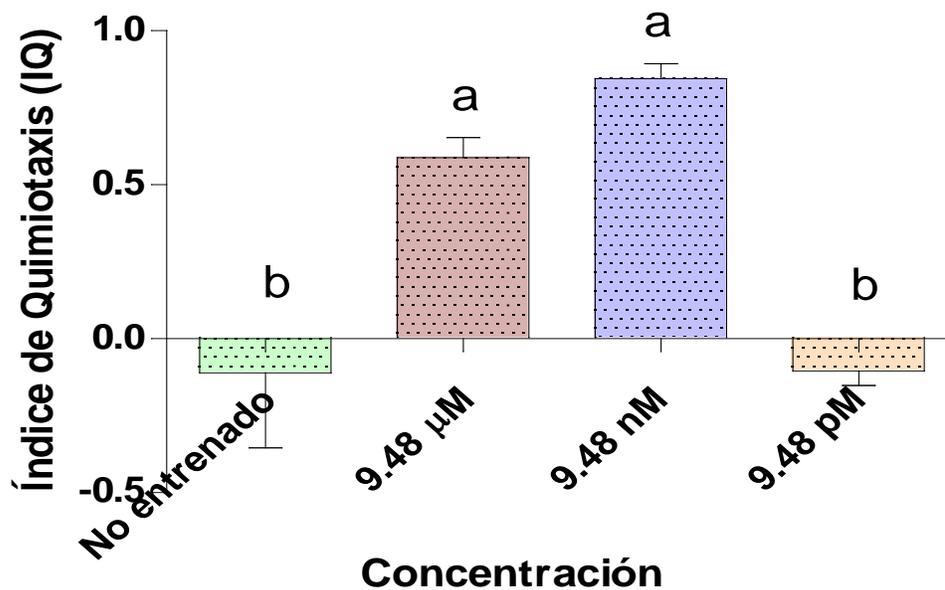
Los resultados del ensayo se muestran en la figura 14. Los nematodos del tratamiento control, a los cuales no se les agregó peróxido ni infusión de café mostraron una sobrevivencia del 100% al final de las 6 horas del ensayo. En el caso de los nematodos a los cuales solo se les adicionó el peróxido de hidrógeno, mostraron un decaimiento de la población de un 44% en la primer hora del ensayo, continuando la muerte de organismos hasta llegar a un 25% de sobrevivencia al final del ensayo. Interesantemente, en esta prueba *in vivo* el mejor resultado de protección de los nematodos se registró con la infusión de café gourmet tostado oscuro, registrando se una sobrevivencia del 93% una vez concluido el ensayo. Las infusiones de café industrial y gourmet tostado claro tuvieron un comportamiento estadísticamente similar, manteniendo un sobrevivencia del 60% de los nematodos al final del ensayo. La infusión de café gourmet sin cafeína tuvo un comportamiento similar al industrial en la mitad del ensayo, si bien en la primer hora el decaimiento de la poblacional fue mayor, de la tercera a la quinta hora se comportaron de forma similar estilísticamente, pero en este caso al final del ensayo se registró una disminución de la sobrevivencia, registrándose un valor de 40%. La infusión de café industrial descafeinado mostró la menor capacidad de protección de los nematodos, registrándose una muerte del 78% de la población desde la primera hora, manteniéndose el 22% de la población sobreviviente hasta el final del ensayo.



**Figura 14:** Supervivencia de *C. elegans* ante el estrés oxidativo y el preacondicionamiento con diferentes infusiones de café,

## 9.5 Determinación de la dosis efectiva 50

Para determinar el efecto de las infusiones de café sobre la prevención de la neurodegeneración, se realizó un ensayo de quimiotaxis, que involucra la memoria asociativa al establecer una relación entre el alimento y un aroma (alcohol isoamilico), de tal forma que los nematodos son entrenados para establecer la asociación entre la comida (*E. coli* OP50) y el alcohol isoamilico. Para que esta prueba pueda ser realizada de manera efectiva, se requiere ajustar la concentración de alcohol que se adicionara en la caja de petri y evitar que el espacio de cabeza de la caja se sature del vapor del alcohol y el nematodo no pueda distinguir entonces hacia donde es la fuente del aroma, La determinación de la dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>), se llevó a cabo, utilizando distintas concentraciones de alcohol isoamilico, las cuales se probaron en el nematodo realizando ensayos de quimiotaxis, concentraciones superiores a 9.8  $\mu$ M no dieron resultados satisfactorios, registrándose índices de quimiotaxis inferiores a 0.2. En la figura 15, se muestra el barrido de concentraciones evaluadas, que van desde 9.8  $\mu$ M a 9.8 pM. En los ensayos en donde se utilizó una concentración de 9.8 nM se registró un índice de quimiotaxis de 0.87, por lo que esta fue elegida para usarse para los siguientes ensayos.



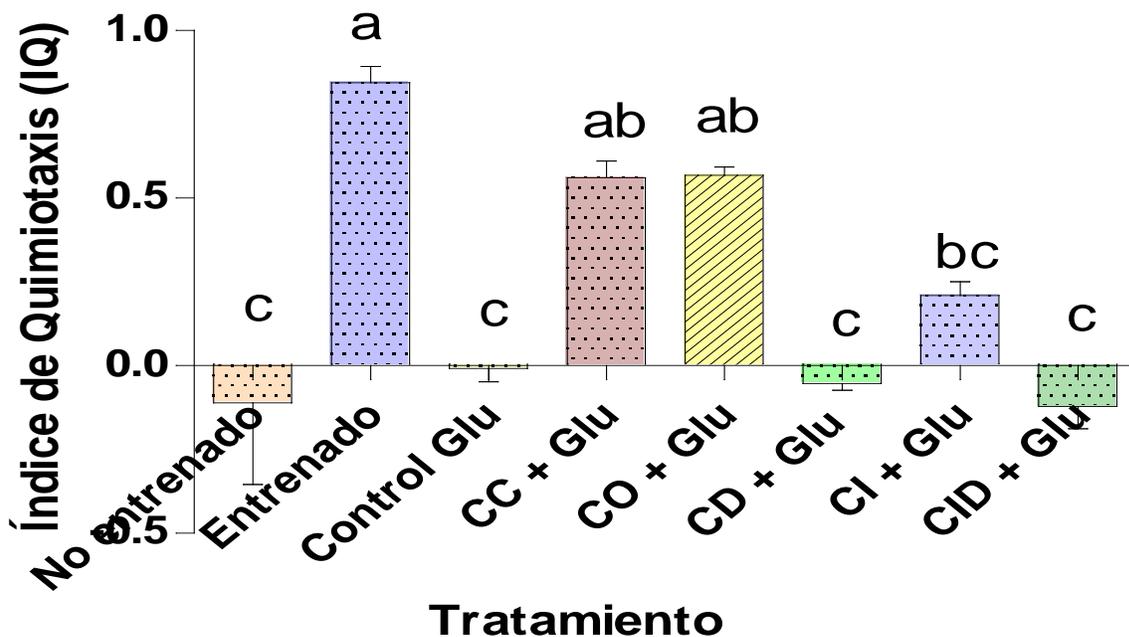
**Figura 15:** evaluación de la DE<sub>50</sub> de alcohol isoamilico sobre el índice de quimiotaxis de nematodos. ANOVA de una vía, la barra representa la SD, prueba post hoc de Tukey p<0.05, letras distintas denotan diferencia significativa.

### 9.6 Evaluación del efecto neuroprotector de las infusiones de café

En particular, se sabe que las dietas con alto contenido de glucosa generan especies reactivas de oxígeno (EROS) (Ray y col., 2012; Mendler y col., 2012), lo cual genera envejecimiento en el nematodo. Para asegurar si en las condiciones de estudio la glucosa indujo un fenotipo de envejecimiento, y neurodegeneración

En primer lugar, el índice de quimiotaxis registrado para los nematodos no entrenados fue de -0.1, que como se esperaba indica un comportamiento aleatorio del nematodo frente al estímulo olfatorio del alcohol isoamilico, debido a que este grupo de nematodos no fue condicionado a responder a la presencia del compuesto. En el grupo de nematodos entrenados, en los cuales se generó la memoria asociativa entre el alimento y el olor del alcohol isoamilico, el índice de

quimiotaxis fue de 0.85, lo que demuestra que los nematodos conservan la memoria de corto plazo y pueden recordar la asociación entre el olor del alcohol isoamilico y la comida, dirigiéndose hacia el punto de la caja donde fue colocada la microgota del alcohol ( 9.8 nM) . En los nematodos que fueron crecidos en presencia de glucosa (60 mM) se observó la perdida completa de la memoria a corto plazo, registrándose un índice de quimiotaxis de -0.02. Una vez validado el modelo de neurodegeneración por hiperglucemia, se procedió a evaluar el efecto de las infusiones de café sobre la prevención de este daño (figura 15). Los nematodos expuestos a las infusiones de los cafés gourmet tostado claro y oscuro, en presencia de glucosa (60 mM), registraron un índice de quimiotaxis de 0.55, lo que representó una recuperación del 65% de la capacidad de memoria de corto plazo en comparación a los nematodos entrenados que no fueron expuestos a la hiperglucemia. En los nematodos expuestos a la infusión del café industrial, se registró un índice de quimiotaxis de 0.23, mientras que las infusiones de los cafés descafeinados, tanto gourmet como industrial, no ejercieron ningún efecto neuroprotector, registrándose un índice de -.09 en promedio, poniendo de manifiesto el impacto negativo del proceso de descafeinado sobre las propiedades nutracéuticas del grano de café, en este caso en particular, sobre la capacidad neuroprotectora en el nematodo.



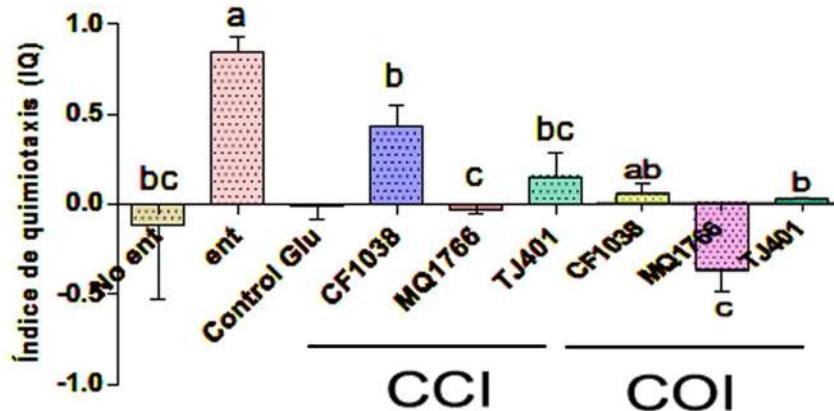
**Figura 15:** Índice de quimiotaxis de nematodos N2WT tratados con infusiones de café + Glucosa 60mM, ANOVA de una vía, la barra representa la SD, prueba post hoc de Tukey  $p < 0.05$ , letras distintas denotan diferencia significativa.

Para abordar sobre el posible mecanismo de acción de las infusiones se probaron estas en tres líneas mutantes de *C. elegans*, las cuales fueron: **TJ401** *age-1* (ortólogo de *PI3K*), mutante resistente al estrés, de mayor longevidad que la silvestre N2, mecanismos activos de respuesta al estrés; **CF1038** *daf-16* (ortólogo de *FoxO*), mutante sensible al estrés por la carencia de este factor transcripcional; **MQ1766** *sod1-5*, mutante nula en los 5 genes que codifican a las variantes de superóxido dismutasa del nematodo, sensible al estrés oxidativo. Los tres genes participan en la vía de señalización por insulina, la cual ha sido involucrada en la toxicidad por glucosa y la neurodegeneración por hiperglucemia.

Los resultados del ensayo de quimiotaxis con las cepas mutantes se puede observar en la figura 16. En las tres primeras barras se muestran los resultados de la cepa silvestre N2, los cuales fueron descritos, donde se demostró que la presencia de una elevada concentración de glucosa

en el medio de cultivo del nematodo provoca la pérdida de la memoria a corto plazo, reflejado en la respuesta negativa en el ensayo de quimiotaxis. Interesantemente, en índice de quimiotaxis de las mutantes **TJ401** y **CF1038** fue mayor en los nematodos tratados con las infusiones de café claro en comparación a los tratados con el café oscuro, lo cual indica que en esta infusión están presentes biomoléculas que pueden activar vías independientes de la insulina para proteger del daño neuronal inducido en la hiperglucemia, aunque no se descarta la participación de la vía, ya que las mutantes mostraron un menor índice en comparación a la cepa silvestre.

En ambos casos la ausencia de la enzima superóxido dismutasa (**MQ1766**) fue incapaz de recuperar la memoria asociativa, por lo cual se deduce que la participación de este gen es esencial en el mecanismo de protección ejercido por las infusiones del café gourmet, lo que además refuerza la posible activación de otras vías de respuesta que pueden promover la transcripción de las superóxido dismutasas. Siendo entonces este un elemento clave en los procesos de neuroprotección.



**Figura 16:** Índice de quimiotaxis en diferentes cepas mutantes de *C. elegans* tratadas con infusiones de café tostado claro (CCI) y tostado oscuro (COI), complementados con Glucosa 60mM, ANOVA de una vía, la barra representa la SD, prueba post hoc de Tukey  $p < 0.05$ , letras distintas denotan diferencia significativa. **TJ401** *age-1* (ortólogo de *PI3K*), **CF1038** *daf-16* (ortólogo de *FoxO*), **MQ1766** *sod1-5*,

## X. Discusión

En la última década se han publicado numerosos estudios sobre los efectos neuroprotectores del café, basados en análisis multivariados en donde se ha observado una correlación positiva entre la ingesta moderada de café (en promedio 2 tazas al día) y la prevención del deterioro cognitivo y la protección de la memoria, los cuales principalmente se afectan negativamente con la edad (Ramírez Prada, 2010; Santos, et al., 2016; Poole, et al., 2017; Gökçen, et al., 2019). Sin embargo, en estos trabajos no se hace una discusión sobre el tipo específico de café que es consumido o la forma en que este es preparado, solo se hace la diferencia entre tomar café regular o añadido con azúcar o descafeinado, donde estos dos últimos han mostrado no tener los efectos neuroprotectores asociados a la bebida. Lo anterior es de suma importancia ya que se ha reportado que tanto la variedad de café, grado de tueste y forma de preparación influyen sobre el perfil bioquímico, por ejemplo Vignoli et al. (2014), evaluaron la actividad antioxidante en diferentes tipos de café, llegando a la conclusión que el café tostado tiene mejor actividad en comparación con el tostado oscuro debido al mayor contenido de compuestos fenólicos. Mencionan además que conforme aumenta el tostado, se incrementa la formación de melanoidinas, principalmente a través de reacciones de Maillard, y que si bien estas tienen actividad antioxidante, en los tuestes extremos, la generación de melanoidinas no compensa la pérdida de fenoles, siendo por lo tanto mejor un tostado claro en comparación al oscuro.

En el presente trabajo se observó que el contenido de fenoles totales y cafeína fue estadísticamente similar en las infusiones preparadas con ambos tipos de tostado (claro y oscuro). En comparación con la infusión del café industrial, ambos tipos de café gourmet presentaron un mayor contenido de fenoles totales, pero la infusión del industrial mostró un mayor contenido de cafeína, lo que concuerda con diversos reportes sobre el tipo de grano de café utilizado; el café gourmet es elaborado con la variedad arábica, por su sabor y aroma más complejo, mientras que el café industrial es elaborado con granos de la variedad robusta debido principalmente a su menor precio en el mercado de granos y el mayor contenido de cafeína y amargor (Benoit, et al., 2006; Yash et al., 2017; Zainuri, et al., 2023). Interesantemente, se observó que el contenido de fenoles totales disminuyó en las infusiones de café descafeinado, en sus dos versiones gourmet e industrial. De acuerdo a diversos reportes, se infiere que el

proceso de descafeinado realizado en ambos tipos de café fue mediante arrastre con agua hirviendo, evitando el uso de solventes químicos, ya que se sabe la cafeína es altamente hidrosoluble, sin embargo, este proceso puede arrastrar además moléculas como azúcares solubles, aminoácidos, así como lípidos y fenoles de bajo peso molecular.

Con respecto a la actividad antioxidante (AA) *in vitro*, evaluada mediante las pruebas de DPPH<sup>-</sup>, ABTS<sup>+</sup> y FRAP, diversos autores argumentan una mayor AA en los cafés de tostado claro, dado el mayor contenido de fenoles. Otros autores argumentan una mayor AA en los café de mayor tostado debido a una mayor concentración de cafeína y melanoidinas, ambas argumentaciones basadas en la pruebas de **DPPH<sup>-</sup>** (se base en la inactivación del radical aniónico, se realiza mediante la donación de un protón o un electrón del agente antioxidante, reduciendo por lo tanto su absorbencia en la prueba, se ha argumentado además, que debido al tamaño y la estructura de la molécula, que esta reacción en mayor medida por ejemplo con fenoles simples), **ABTS<sup>+</sup>**, (que es un radical cationico muy sensible a la presencia de radicales libres, se base en la capacidad de los antioxidantes de atrapar o quelar mediante la interacción de cargas a este radical, debido a la estructura del radical se argumente interactúa mejor con moléculas complejas como los polifenoles), **FRAP** (detecta la capacidad de los antioxidantes de reducir el ión férrico al ion ferroso, es un método más inespecífico en comparación a los dos anteriores pues no hay una discriminación entre tipos de antioxidantes o mecanismos de acción, siendo relacionada la prueba como una medición de la capacidad antioxidante total).

En el presente trabajo se observó una mayor capacidad antioxidante *in vitro* en las infusiones de café industrial, posiblemente atribuible al mayor contenido de polifenoles presentes en la variedad robusta utilizada en la elaboración del café industrial en comparación a la variedad arábica del café gourmet (Vignoli et al. 2014), lo cual fue más evidente en la prueba de FRAP, que como fue mencionado anteriormente, se puede interpretar como actividad antioxidante total. Cabe destacar que las pruebas se realizaron con muestras de las infusiones preparadas para contener el mismo contenido de fenoles totales (10 µg/mL), y de esta forma evidenciar las diferencia en capacidad o potencia antioxidante. Cabe destacar que el contenido de fenoles totales entre las infusiones de café gourmet e industrial descafeinados fue similar, la actividad antioxidante de la presentación industrial fue mayor en todos los casos a la presentación gourmet, evidenciando un

posible enriquecimiento de polifenoles después del proceso de descafeinado, los cuales tiene una mayor actividad antioxidante en comparación a los fenoles simples que pueden perderse durante el proceso de descafeinado y que concuerda con los reportes de un mayor contenido de este tipo de fenoles en la variedad robusta.

Las pruebas anteriores si bien han sido ampliamente aceptadas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos, se han cuestionado debido a que se enfrentan las biomoléculas a radicales sintéticos que no se encuentran en la naturaleza, por lo cual se ha argumentado que estas pruebas *in vitro* no necesariamente reflejan la capacidad antioxidante de las moléculas evaluadas en los sistemas biológicos. Por lo anterior, se realizó el ensayo *in vivo* al exponer a los nematodos preacondicionados con las diferentes infusiones de café a un estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno, este tipo de estrés ha sido ampliamente reportado en diversos trabajos que evalúan el papel de productos naturales en la prevención del estrés oxidativo (Kumsta, et al., 2011; Jo Aan, et al 2013; Hernández-Cruz, et al 2023). En esta prueba, se observó que la infusión de café industrial descafeinado parece haber sensibilizado a los nematodos ya que desde la primera hora se observó la muerte del 80% de la población, el 20% restante se mantuvo durante las 6 horas del ensayo. Por otro lado, al comparar el café industrial y el gourmet se observó una mayor protección antioxidante del café gourmet de tueste oscuro, seguido del café gourmet de tueste claro, aunque cabe mencionar que al final del ensayo la sobrevivencia de los nematodos con esta infusión fue estadísticamente similar a los expuestos al café industrial clásico. Además, el comportamiento en la sobrevivencia de los nematodos expuestos al estrés oxidativo y pretratados con el café industrial clásico fue estadísticamente similar a los pretratados con el café gourmet descafeinado, aunque numéricamente mayor en el industrial (10% mayor). Esta observación resulta interesante ya que como se comentó anteriormente, el café industrial es el de mayor contenido de cafeína, a la cual se le han atribuido los mayores beneficios del café, existiendo diversos reportes que se han enfocado a estudiar los efectos de la cafeína pura en la prevención de enfermedades, sin embargo el presente resultado pone de manifiesto que en la mezcla compleja del café gourmet existe una combinación de biomoléculas tales que logran mantener la viabilidad de los nematodos en el mismo nivel entre el café descafeinado gourmet y el industrial clásico. Y esta complejidad de biomoléculas actuando en conjunto es aún mayor en

el café gourmet de tueste oscuro que llega a mantener el 90% de sobrevivencia en la población de nematodos al ser expuestos al Peróxido de hidrógeno.

Para seguir investigando en este tema, se indujo el estrés oxidativo de “forma natural” al adicionar altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo de los nematodos, que de acuerdo a diferentes reportes puede provocar un aumento del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS), la disminución de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y el contenido de glutatión reducido (GSH), acelerando por lo tanto el proceso de envejecimiento e incrementando el daño neurodegenerativo. La hiperglucemia sostenida induce la formación de ROS mediante el aumento de la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs), la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la cadena de transporte de electrones mitocondrial, provocando daños en diversas macromoléculas que incluyen proteínas específicas asociadas a los diversos procesos neurodegenerativos (Lee, et al., 2009; Rains y Jain, 2011; Salim y Rajini, 2014; Gowd, et al., 2017; Pinkas, et al., 2018; Li, et al., 2023). En este trabajo, se confirma el daño neurológico provocado por la hiperglucemia, como se observó en la figura 15 en el ensayo de quimiotaxis. Este ensayo se basa en una forma simple de aprendizaje y memoria demostrada en *C. elegans* al registrar la capacidad del nematodo para almacenar memoria a corto y largo plazo al establecer una asociación entre los quimioatrayentes y los alimentos (*E coli* OP50). La memoria de experiencias y la información aprendida es fundamental para que *C. elegans* tome decisiones que le ayuden a sobrevivir. a través de la detección neuronal específica de alimentos y olores químicos, y puede asociar estados nutritivos con olores químicos y la patogenicidad de una fuente de alimento. *C. elegans* es capaz de aprender y recordar a través de muchas modalidades sensoriales, incluidas la mecanosensación, la quimiosensación, la termosensación. Este comportamiento está asociado con varias formas de aprendizaje, incluido el aprendizaje dependiente del estado, el condicionamiento clásico y el aprendizaje aversivo. Muchos de los genes involucrados en el aprendizaje y la memoria en *C. elegans* son homólogos a genes implicados en el aprendizaje y la memoria en los mamíferos. A pesar de su sistema nervioso relativamente simple, el nematodo, como muchos otros animales, puede codificar la memoria después del aprendizaje asociativo, almacenar la memoria recién adquirida a corto plazo y

consolidarla en una memoria más estable y duradera (Zhang, et al., 2005; Torayama, et al., 2007; Kauffman, 2010; Kauffman, et al., 2011; Margie, et al., 2013; Wong y Rankin, 2019; Cohen y Rabinowitch, 2024; Heydarian, et al., 2024)

En el presente estudio se observó, como era de esperar, que los nematodos no entrenados no responden al quimioatrayente (alcohol isoamilico), mientras que los nematodos que fueron condicionados para asociar la fuente de alimentación con el quimioatrayente respondieron de forma positiva, registrando un índice de quimiotaxis de 0.9., lo que indica que la mayoría de la población de nematodos entrenados fue capaz de recordar el aroma de la comida (quimioatrayente) y moverse en la dirección en que fue colocado el atrayente. Cuando los nematodos fueron crecidos previamente en una condición de hiperglucemia, se pudo observar el daño neural generado por este estrés, al registrar un índice de quimiotaxis de -0.05, es decir perdieron la capacidad de recordar la asociación entre la comida y el atrayente, moviéndose entonces de forma aleatoria en la caja de petri en busca de la comida. Sin embargo, cuando en el medio de cultivo, además de la alta concentración de glucosa se adicionó con la infusiones de café gourmet claro u oscuro, se registró en efecto neuroprotector, al conservar los nematodos el 65% de su memoria a corto plazo, lo que concuerda con las diferentes argumentaciones acerca de la poca correlación entre las pruebas antioxidantes *in vitro* con las actividad de los antioxidantes en los sistemas biológicos, ya que los nematodos a los cuales se les adicionó la infusión del café industrial, se redujo un 73% el indice de quimiotaxis, es decir perdieron en gran medida la memoria asociativa de corto plazo, recordando que este infusión fue la que mejores resultados registró en general en las pruebas *in vitro*.

Los ensayos con las cepas mutantes mostraron que la actividad de superoxido dismutasa es esencial para el efecto neuroprotector, es decir los compuestos no están actuando como antioxidantes, sino que están activando el sistema antioxidante endógeno del nematodo, lo que explicaría la falta de correlación entre las pruebas *in vitro*, en las cuales las moléculas actúan de forma directa neutralizando los radicales, y las pruebas *in vivo* en donde las moléculas deben interferir con las vías de señalización del organismo y activar diferentes respuestas genéticas y por tanto fisiológicas., de tal forma que la capacidad protectora estaría entonces vinculada primordialmente a la capacidad de interactuar con los diferentes elementos de estas vías de

señalización. Lo anterior parecería estar confirmado por las diferencias en la respuesta de las cepas mutantes **TJ401** age-1 y **CF1038** daf-16 (figura 16). en donde los nematodos tratados con la infusión de café tostado oscuro disminuyeron alrededor de un 80% su efecto neuroprotector, mientras que la disminución en las mutantes tratadas con la infusión de café claro la disminución fue de alrededor de un 50%, evidenciando una diferencia importante entre las dos infusiones, y aportando a la argumentación de mejores propiedades del café de tostado claro, como se mencionó anteriormente, ambas infusiones dependen de la actividad de la superoxido dismutasa para realizar el efecto neuroprotector. Los datos parecen sugerir que los metabolitos presentes en el café de tuesto oscuro interactúan principalmente con la vía de señalización de la insulina, dado que las mutantes en Age-1 y Daf-16, dos componentes claves de esta vía, no pudieron mantener en efecto neuroprotector registrado en la cepa silvestre. Sin embargo en las cepas mutantes tratadas con la infusión de café claro se ve un mayor efecto neuroprotector en comparación del anterior, si bien menor que la silvestre; lo que puede sugerir que además de la interacción con los elementos de la vía de la insulina, podría estar activando otras vías de señalización como SNK-1, HSF-1 o SIR-2.1, las cuales pueden activar la transcripción de genes relacionados a la prevención del estrés y la longevidad, como la superoxido dismutasa, independientemente a la vía de señalización de la insulina. (Ding, et al., 2017; Ye, et al., 2020; Wang et al., 2022; Pei et al., 2024).

## XI. Conclusiones

- El café gourmet tostado claro y oscuro previenen la neurodegeneración en el modelo de *Caenorhabditis elegans*.
- La actividad de la enzima superóxido dismutasa es determinante para la actividad neuroprotectora del café.
- El proceso de descafeinado provoca la pérdida de la capacidad neuroprotectora del café.
- El café gourmet tueste claro puede activar diferentes vías relacionadas al proceso de neuroprotección.

## XII. Bibliografía

- Adi Pinkas, Michael Lawes, Michael Aschner, System-specific neurodegeneration following glucotoxicity in the *C. elegans* model, *NeuroToxicology*, Volume 68, 2018, Pages 88-90,
- Alarcón-Aguilar A, Maycotte-González P, Cortés-Hernández P, López-Diazguerrero NE, Königsberg M. Dinámica mitocondrial en las enfermedades neurodegenerativas. *Gac Med Mex.* 2019;155(3):276-283. doi: 10.24875/GMM.18004337. PMID: 31219465.
- Altintas, O.; Park, S.; Lee, S.J.V. The role of insulin/IGF-1 signaling in the longevity model invertebrates, *C. elegans* and *D. melanogaster*. *BMB Reports.* 2016, 49, 81-2.
- Barsyte, D.; Lovejoy, D.A.; Lithgow, G.J. Longevity and heavy metal resistance in *daf-2* and *age-1* long-lived mutants of.
- Bauer, J.H.; Goupil, S.; Grber, G.B.; Helfand, S.L. An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, 101, 12985.
- Becker, E.M.; Nissen, L.R.; Skibsted, L.H. Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *Eu.r Food. Res. Technol.* 2004, 219, 561–71.
- Benoit Bertrand, Philippe Vaast, Edgardo Alpizar, Hervé Etienne, Fabrice Davrieux, Pierre Charmetant . Comparison of bean biochemical composition and beverage quality of Arabica hybrids involving Sudanese-Ethiopian origins with traditional varieties at various elevations in Central America. *Tree Physiology*, Volume 26, Issue 9, 1239–1248 (2006,)
- 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
- Bonda, D.; Wang, X.; Perry, G. “Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention,” *Neuropharmacology*, 2010, 59, pp. 290–294.
- Bonomini, F.; Rodella, L.F.; Rezzani, R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging. Dis.* 2015, 6, 109-120.
- Bossy-Wetzel, E.; Petrilli, A.; Knott, A. “Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction,” *Trends in Neurosciences* 2008, 31, pp. 609–616.

- Caroline Kumsta, Maike Thamsen, and Ursula Jakob Effects of Oxidative Stress on Behavior, Physiology, and the Redox Thiol Proteome of *Caenorhabditis elegans* ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING Volume 14, Number 6, 2011, 1023-1036
- Carvajal Carvajal, Carlos. 2016. Biología molecular de la enfermedad de Alzheimer. *Medicina Legal de Costa Rica*, 33(2), 104-122
- Cheng, S.C.; Li, W.H.; Shi, Y.C.; Yen, P.L.; Lin, H.Y.; Liao, H.C.; Chang, S.T. Antioxidant Activity and Delayed Aging Effects of Hot Water Extract from *Chamaecyparis obtuse* var. *formosana* Leaves. *J. Sci. Food. Agric.* 2014, 62, 4159- 4165.
- Chinnu Salim, P.S. Rajini, Glucose feeding during development aggravates the toxicity of the organophosphorus insecticide Monocrotophos in the nematode, *Caenorhabditis elegans*, *Physiology & Behavior*, Volume 131, 2014, Pages 142-148,
- Ciechanover, A., Kwon, Y. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med* 47, e147 (2015).
- Ding, A.J. S.Q. Zheng, X.B. Huang, T.K. Xing, G.S. Wu, H.Y. Sun, S.H. Qi, H.R. Luo, *Nat. Prod. Bioprospect.* 7, 335-404 (2017).
- 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.
- Drago, M.E.; López, M.; Espuñes, T.R. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Rev. Mex.Cie. Farm.* **2006**, 37, 58-68.
- 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/reb2017/reb171b.pdf>
- Ferreiro, E.; Oliveira, C.; Pereira, C. “The release of calcium from the endoplasmic reticulum induced by amyloid-beta and prion peptides activates the mitochondrial apoptotic pathway,” *Neuro. Dis*, **2008**, 30, pp. 331–342.

- García, F.J. Evaluación in vitro e in vivo de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral de la Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Murcia, España. 2005, Pp., 18.
- 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.
- Gökçen B.B., Sanlier N. Coffee consumption and disease correlations. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2019;59:336–348. CRITICAL REVIEWS IN FOOD SCIENCE AND NUTRITION 2019, VOL. 59, NO. 2, 336–348
- Gowd, V. Z. Jia, and W. Chen, “Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes - a review of recent advances,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 68, pp. 1–13, 2017
- Gregory J, Vengalasetti YV, Bredesen DE, Rao RV. Neuroprotective Herbs for the Management of Alzheimer's Disease. *Biomolecules.* 2021 Apr 8;11(4):543. doi: 10.3390/biom11040543.
- 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/ANMALZHEIMER.pdf](https://www.anmm.org.mx/publicaciones/ultimas_publicaciones/ANMALZHEIMER.pdf)
- Guzmán-Hernández, A. Análisis de la actividad de los compuestos fenólicos del frijol en la tolerancia al estrés oxidante en *Caenorhabditis elegans*. Tesis de maestría **2019**.
- Halliwel, B.; Chirico, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **1993**, 57, 715S–724S.
- Hernández-Cruz, E. Y., Eugenio-Pérez, D., Ramírez-Magaña, K. J., & Pedraza-Chaverri, J. (2023). Effects of Vegetal Extracts and Metabolites against Oxidative Stress and Associated Diseases: Studies in *Caenorhabditis elegans*. *ACS Omega*, 8(10), 8936-8959. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07025>
- Heydarian, D., Flavel, M., Munasinghe, M., Jois, M., & Thomas, J. (2024). Improving Cognitive and Chemosensory Function in *Caenorhabditis elegans* Through Polyphenol-Rich Sugarcane Extract. *Stresses*, 4(4), 816-826

- Hoekman, M.F., Jacobs, F.M., Smidt, M.P., Burbach, J.P. 2006 Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. *Gene Expr Patterns* 6, 134-140.
- Hsu, A.; Murphy, C.; Kenyon, C. Regulación del envejecimiento y las enfermedades relacionadas con la edad por DAF-16 y el factor de choque térmico. *Science*. 2003; 300 : 1142-1145.
- Hu, Wei; Yang, Zhi; Yang, Wenwen; Han, Mengzhen; Xu, Baoping; Yu, Zihao; Shen, Mingzhi; Yang, Yang (2019). Roles of Forkhead Box O (FoxO) Transcription Factors in Neurodegenerative Diseases: A panoramic view. *Progress in Neurobiology*, (), 101645–. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.101645
- Kauffman, A. L. Insulin signaling and dietary restriction differentially influence the decline of learning and memory with age. *PLoS Biol.* 8, e1000372-e1000372 (2010).
- Kauffman, A., Parsons, L., Stein, G., Wills, A., Kaletsky, R., Murphy, C. C. elegans Positive Butanone Learning, Short-term, and Long-term Associative Memory Assays. *J. Vis. Exp.* (49), e2490, doi:10.3791/2490 (2011).
- Kim, G.H.; Kim, J.E.; Rhie, S.J.; Yoon, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurobiol.* **2015**, 24, 325–340.
- Labbadia, J.; Morimoto, R. "Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts," *Trends Bioc. Sci*, 2013, 38, pp. 378–385
- Lee, S. J. C. T. Murphy, and C. Kenyon, "Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression," *Cell Metabolism*, vol. 10, no. 5, pp. 379–391, 2009
- Lezi, E.; Swerdlow, R. Mitochondria in neurodegeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012, 942, 269–286
- Manolopoulos KN, Klotz LO, Korsten P, Bornstein SR, Barthel A. Linking Alzheimer's disease to insulin resistance: the FoxO response to oxidative stress. *Mol Psychiatry*. 2010 Nov;15(11):1046-52. doi: 10.1038/mp.2010.17. PMID: 20966918.
- Margie O, Palmer C, Chin-Sang I. C. elegans chemotaxis assay. *J Vis Exp. Journal of Visualized Experiments* 2013 Apr 27;(74)

- Mayor-Oxilia, R. 2010. Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29.
- MedlinePlus, (2021). Antioxidantes, Medline plus. <https://medlineplus.gov/spanish/antioxidants.html>
- Monn, J.; Shibamoto, T.; Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1655-1666
- Netanel Cohen · Ithai Rabinowitchl. Resolving transitions between distinct phases of memory consolidation at high resolution in *Caenorhabditis elegans* *Science*, Volume 27, Issue 11, 111147
- Nunomura, A., Perry, G., Hirai, K., Aliev, G., Takeda, A., Chiba, S., & Smith, M. A. (1999). Neuronal RNA oxidation in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893(1), 362-364.
- 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.
- Panov, A.; Gutekunst, C.; Leavitt, B. "Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines," *Nature Neuroscience*, 2002, 5, pp. 731–736.
- Pei, H., Lin, Z., Yao, K. *et al.* Ovalbumin promotes innate immune response of *Caenorhabditis elegans* through DAF-16 and SKN-1 pathways in insulin/IGF-1 signaling. *J Physiol Biochem* 80, 541–559 (2024)
- Peña-Montes, D.; Cervantes-Huerta, M.; Ríos-Silva, M.; Trujillo, X.; Huerta, M.; Noriega-Cisneros, R.; Salgado-Garciglia, R.; Saavedra-Molina, A. Protective effect of the Hexanic Extract of *Eryngium carlinae* Inflorescences In Vitro, in Yeast, and in Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. *Antiox.* 2019, 8, 73.
- Pietsch, K.; Saul, N.; Menzel, R.; Stürzenbaum, S.R.; Steinberg, C.E.W. Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 2009, 10, 565–578. *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* 2001, 15, 627–634.
- Poole R., Kennedy O.J., Roderick P., Fallowfield J.A., Hayes P.C., Parkes J. Coffee consumption and health: Umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ.* 2017;359 *British Medical Journal*

- Rachael L. Neve, Peter Harris, Kenneth S. Kosik, David M. Kurnit, Timothy A. Donlon, Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2, *Molecular Brain Research*, Volume 1, Issue 3, 1986, 271-280, 0169-328X
- Rains J. L. and S. K. Jain, "Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 50, no. 5, pp. 567–575, 2011.
- Ramírez-Prada, D.M. Coffee, caffeine vs. health review of the effects of coffee consumption in health. *Universidad y Salud* 2010, 1 (2): 156-167.
- Rong Li , 1,2 Mingfang Tao,1,3 Tingting Xu,1 Jinsong Wang,2 Rui Duan , 4 Ting Wu,1 Siyi Pan,1 and Xiaoyun Xu, Protective Effects of *Artemisia selengensis* Turcz. Leaf Extract on *Caenorhabditis elegans* under High Glucose Diet. *Journal of Food Biochemistry* Volume 2023, Article ID 5762922, 12 pages
- Santos R.M., Lima D.R. Coffee consumption, obesity and type 2 diabetes: A mini-review. *Eur. J. Nutr.* 2016;55:1345–1358
- 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
- Shirakabe A, Zhai P, Ikeda Y, Saito T, Maejima Y, Hsu CP, Nomura M, Egashira K, Levine B, Sadoshima J. Drp1-Dependent Mitochondrial Autophagy Plays a Protective Role Against Pressure Overload-Induced Mitochondrial Dysfunction and Heart Failure. *Circulation*. 2016 Mar 29;133(13):1249-63. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502. 2016. PMID: 26915633; PMCID: PMC4811679.
- Sienes Bailo P, Llorente Martín E, Calmarza P, Montolio Breva S, Bravo Gómez A, Pozo Giráldez A, Sánchez-Pascuala Callau JJ, Vaquer Santamaría JM, Dayaldasani Khialani A, Cerdá Micó C, Camps Andreu J, Sáez Tormo G, Fort Gallifa I. Implicación del estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas y posibles terapias antioxidantes. *Adv Lab Med*. 2022 Dec 22;3(4):351–60. Spanish. doi: 10.1515/almed-2022-0022. PMCID: PMC10197511.
- Torayama, I., Ishihara, T., Katsura, I. *Caenorhabditis elegans* integrates the signals of butanone and food to enhance chemotaxis to butanone. *J Neurosci*. 27, 741-741 (2007).

- Van Bulck, M., Sierra-Magro, A., Alarcon-Gil, J., Perez-Castillo, A., & MoralesGarcia, J. 2019. Novel Approaches for the Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 719.
- 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.
- Vignoli, Josiane Alessandra , Marcelo Caldeira Viegas, Denisley Gentil Bassoli, Marta de Toledo Benassi, Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees, *Food Research International*, Volume 61, 2014, Pages 279-285,
- Virgen-Ortiz Jose Juan 2020, Método de cuantificación de cafeína, Método no publicado
- 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.
- Wang, J., Liu, X., Hang, S. *et al.* Onion Vinegar Quality Evaluation and its Alleviate Oxidative Stress Mechanism in *Caenorhabditis elegans* Via SKN-1. *Plant Foods Hum Nutr* 77, 206–211 (2022)
- Wong, J., & Rankin, C. (2019, May 23). *Caenorhabditis elegans* Learning and Memory. *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience*. Retrieved 24 Feb. 2025
- Xin, Z., Ma, Z., Hu, W., Jiang, S., Yang, Z., Li, T., Chen, F., Jia, G., Yang, Y. 2017 FOXO1/3: Potential suppressors of fibrosis. *Ageing Res Rev* 41, 42-52.
- Yang J, Huang XB, Wan QL, Ding AJ, Yang ZL, Qiu MH, Sun HY, Qi SH, Luo HR. Otophyllouside B Protects Against A $\beta$  Toxicity in *Caenorhabditis elegans* Models of Alzheimer's Disease. *Nat Prod Bioprospect.* 2017 Apr;7(2):207-214. doi: 10.1007/s13659-017-0122-1. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28194725; PMCID: PMC5397390.
- Yash Khapre, William Kyamuhangire, Ezekiel Kihara Njoroge, Cecilia Wagikondi Kathurima. Analysis of the diversity of some arabica and robusta coffee from Kenya and Uganda by sensory and biochemical components and their correlation to taste. *IOSR Journal of*

Environmental Science, Toxicology and Food Technology Volume 11, Issue 10 39-43  
(2017)

Ye, Yongli & Gu, Qingyin & Sun, Xiulan. (2020). Potential of *Caenorhabditis elegans* as an antiaging evaluation model for dietary phytochemicals: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19. 10.1111/1541-4337.12654.

Zainuri , Dewa Nyoman Adi Paramartha, Amira Fatinah, Rini Nofrida, Novia Rahayu, Ines Marisya Dwi Anggraini, Qabul Dinanta Utama, The chemical characteristics of arabica and robusta green coffee beans from geopark Rinjani, Indonesia. *BIOTROPIA* Vol. 30 No. 3, 2023: 318 - 328

Zhang, Y., Lu, H., Bargmann, C. I. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 438, 179-179 (2005).

# Brianda Lizbeth Paz Cruz

## Estudio de la infusión de café oscuro en la prevención de enfermedades neurodegenerativas en Caenorh

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:434167506

Fecha de entrega

26 feb 2025, 7:50 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

26 feb 2025, 7:57 a.m. GMT-6

Nombre de archivo

Estudio de la infusión de café oscuro en la prevención de enfermedades neurodegenerativas en ....pdf

Tamaño de archivo

1.5 MB

70 Páginas

18,309 Palabras

103,292 Caracteres

# 47% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

## Fuentes principales

- 47%  Fuentes de Internet
- 17%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

## Marcas de integridad

### N.º de alerta de integridad para revisión



#### Caracteres reemplazados

22 caracteres sospechosos en N.º de páginas

Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Maestría en Ciencias en Biología Experimental	
Título del trabajo	Estudio de la infusión de café oscuro en la prevención de enfermedades neurodegenerativas en <i>Caenorhabditis elegans</i>	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	LBT. Brianda Lizbeth Paz Cruz	1237897a@umich.mx
Director	D.C. Josué Altamirano Hernández	josue.altamirano@umich.mx
Codirector	na	na
Coordinador del programa	D.C. Mauro Manuel Martínez Pacheco	mae.cs.biologia.experimental@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	si	En la traducción del resumen al idioma ingles

# Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	no	
Traducción a otra lengua	si	En la traducción del resumen al idioma ingles
Revisión y corrección de estilo	no	
Análisis de datos	no	
Búsqueda y organización de información	no	
Formateo de las referencias bibliográficas	no	
Generación de contenido multimedia	no	
Otro	no	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	LBT. Brianda Lizbeth Paz Cruz 
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán a 24 de febrero de 2025