



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS  
POR ALUMINIO Y LA BIOSÍNTESIS DE CAFEÍNA EN  
SUSPENSIONES CELULARES DE *Coffea arabica* L.**

Tesis que presenta

ROBERTO JUSSEFF PECH KÚ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis del **IBQ. Roberto Jusseff Pech Kú** titulado: **ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS POR ALUMINIO Y LA BIOSÍNTESIS DE CAFEÍNA EN SUSPENSIONES CELULARES DE *Coffea arabica* L.** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas en la línea de investigación Interacción-Medio Ambiente en el laboratorio 10 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección la Dra. Soledad María Teresa Hernández Sotomayor, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

---

Dr. Manuel Martínez Estevez  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 26 de septiembre del 2016.

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

**IBQ. ROBERTO JUSSEFF PECH KÚ**

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Papel de los mensajeros secundarios del sistema de transducción de señales fosfolípido, en la regulación de la respuesta al estrés abiótico en dos cultivos de interés comercial" con el apoyo del proyecto CONACYT No. 219893, bajo la dirección de la Dra. S.M. Teresa Hernández Sotomayor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más profundo y sincero agradecimiento a la Dra. S.M. Teresa Hernández Sotomayor por la orientación, el seguimiento y el apoyo recibido a lo largo de estos dos años de mi formación académica.

Quisiera agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de la beca N° 337938. También quiero dar gracias al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por permitirme hacer uso de sus instalaciones para llevar a cabo la realización de este proyecto de tesis.

Deseo expresar mi agradecimiento a mi comité tutorial integrado por la Dra. Teresa Hernández Sotomayor, el Dr. Felipe Vázquez Flota y la Dra. Beatriz Adriana Rodas Junco por su importante apoyo y motivación para terminar con éxito el presente trabajo de investigación.

Quiero darle un especial agradecimiento a mi comité revisor integrado por: La Dra. Teresa Hernández Sotomayor, el Dr. Felipe Vázquez Flota, el Dr. Manuel Martínez Estévez, la Dra. Beatriz Adriana Rodas Junco y el Dr. Gabriel Lizama Uc, por su amable apoyo en las observaciones y comentarios que fueron muy necesarias en la revisión del escrito de tesis.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud al M. en C. Armando Muñoz Sánchez, al Dr. Víctor Manuel Gonzalez Mendoza, a la M. en C. Miriam Monforte González y a la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por su apoyo técnico que me proporcionaron, y por compartirme sus experiencias y conocimientos.

A mis amigos del laboratorio 10 de la UBBMP, por sus ánimos infundidos y por su confianza depositada con sus críticas constructivas. Gracias a: Julieta, Ibis, Laura, Víctor, Jacqueline, Brenda, Carmita, Maru, Yahaira.

Por último un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y los ánimos recibidos de mi familia.

## **DEDICATORIAS**

Dedico esta tesis a Dios en nombre de mis padres, quienes me han inspirado para la conclusión de esta tesis de Maestría. Con todo cariño y mi amor por todo lo que hicieron en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños. A ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento. Papá y mamá. También a mis hermanitos Jessly, Josué y Said, por haber soportado mis malos ratos de estrés.

A mi más grande amigo del alma Eduardo por su apoyo constante y quien me motivó a seguir adelante. Hacer un cambio en tu vida asusta. Pero, ¿sabes que asusta más? Lamentarte de no haberlo hecho.

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y a cada uno de ellos les dedico una de estas páginas de mi tesis.

---

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>3</b>
ANTECEDENTES .....	3
1 EL CAFETO.....	3
1.1 EL ORIGEN Y LA TAXONOMÍA DEL CAFETO.....	3
1.2 BIOLOGÍA DEL CULTIVO DEL CAFETO .....	4
1.2.1. COMPOSICIÓN DEL CAFÉ .....	6
1.3 EL CAFETO EN MÉXICO.....	7
1.4 LOS SUELOS ÁCIDOS .....	9
1.5 EL ALUMINIO.....	12
1.5.1. EFECTO DEL ALUMINIO EN PLANTAS .....	12
1.5.2. ESTUDIO DEL ALUMINIO EN SISTEMAS <i>In vitro</i> .....	15
1.6 EL METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS.....	16
1.6.1 ESTUDIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO EN CULTIVOS <i>In vitro</i> .....	17
1.7 LA CAFEÍNA.....	18
1.7.1. ESTUDIO DE LA CAFEÍNA EN PLANTAS.....	20
1.7.2. REGULACIÓN METÁBOLICA DE LA CAFEÍNA SINTASA .....	23
1.7.3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA CAFEÍNA SINTASA .....	27
HIPÓTESIS .....	32
JUSTIFICACIÓN.....	32

---

OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	34
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>35.</b>
EL ALUMINIO INDUCE LA BIOSÍNTESIS DE CAFEÍNA EN SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	35
2.1 INTRODUCCIÓN.....	35
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
2.2.1.CONDIONES DE CULTIVO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	36
2.2.2.TRATAMIENTO CON $AlCl_3$ .....	36
2.2.3.DETERMINACIÓN DEL PESO FRESCO Y PESO SECO .....	36
2.2.4. EXTRACCIÓN DE LA CAFEÍNA .....	37
2.2.5.DETERMINACIÓN DE LA CAFEÍNA A TRAVÉS DE HP-TLC .....	37
2.2.6.CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR DE CAFEÍNA POR HP-TLC .....	38
2.3. RESULTADOS.....	39
2.3.1.IDENTIFICACIÓN DE LA CAFEÍNA EN EXTRACTOS DE SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	39
2.3.2.NIVELES DE CAFEÍNA DURANTE EL CICLO DE CULTIVO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	41
2.3.3. BIOSÍNTESIS DE CAFEÍNA Y ESTRÉS POR EL $AlCl_3$ EN SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	43

---

2.4. DISCUSIÓN. ....	48
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>51</b>
ACTIVIDAD DE LA CAFEÍNA SINTASA EN RESPUESTA AL $\text{AlCl}_3$ EN SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	51
3.1 INTRODUCCIÓN. ....	51
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	52
3.2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PROTEÍCO .....	52
3.2.2. CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO DE BSA. ....	52
3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CAFEÍNA SINTASA <i>In vitro</i> . 53	
3.3 RESULTADOS .....	54
3.3.1. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CS EN EXTRACTOS CRUDOS DE SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	54
3.3.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CS BAJO EL ESTRÉS DEL $\text{AlCl}_3$ EN SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	55
3.4. DISCUSIÓN. ....	57
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>59</b>
NIVELES DE TRANSCRITOS DE LA CS EN RESPUESTA AL $\text{AlCl}_3$ EN SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. arabica</i> L. ....	59
4.1 INTRODUCCIÓN.....	59
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	60
4.2.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL POR EL MÉTODO DE TRIZOL .....	60

---

4.2.2. SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO (ADNc) .....	60
4.2.3. CONDICIONES DE REACCIÓN DE LA PCR PUNTO FINAL Y TIEMPO REAL .....	61
4.2.4. VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE ELECTROFORESIS .....	61
4.2.5. DISEÑO DE LOS INICIADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA A LA CS .....	62
4.2.6. DISEÑO DE LOS INICIADORES DEL GEN QUE CODIFICA A LA TUBULINA .....	64
4.3 RESULTADOS .....	66
4.3.1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL .....	66
4.3.2. SELECCIÓN DEL INICIADOR ESPECÍFICO PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN CS .	67
4.3.3. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LA CS MEDIANTE PCR PUNTO FINAL .....	68
4.3.4. ANÁLISIS DE LOS NÍVELES DE LOS TRANSCRITOS DE LA CS MEDIANTE RT-qPCR	69
4.4 DISCUSIÓN .....	71
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>73</b>
5.1 DUSCUSIÓN GENERAL .....	73
<b>CAPÍTULO VI .....</b>	<b>77</b>
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	77
6.1. CONCLUSIONES. ....	77
6.2. PERSPECTIVAS.....	78
BIBLIOGRAFÍA .....	79

---

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Planta de café ( <i>Coffea</i> ) .....	5
Figura 1.2. Estructura típica radical de un café adulto .....	6
Figura 1.3. Entidades federativas productoras de café en México .....	9
Figura 1.4. Relación entre el cambio de pH en el suelo y los niveles de disponibilidad de diferentes elementos presentes en el suelo. ....	10
Figura 1.5. Subsuelos ácidos del mundo. ....	11
Figura 1.6. Las plantas están expuestas a diferentes factores de estrés del medio ambiente que las rodea . ....	13
Figura 1.7. Modelo de una célula radicular en donde se ilustran los mecanismos de resistencia y detoxificación en respuesta del aluminio. ....	14
Figura 1.8. Estructura química de la cafeína. ....	18
Figura 1.9. La cafeína inhibe la enzima fosfodiesterasa y genera la acumulación de AMPc intracelular. ....	20
Figura 1.10. Ruta de biosíntesis de la cafeína a partir de la xantosina y ruta del catabolismo de la xantina a CO <sub>2</sub> y NH <sub>4</sub> . ....	22
Figura 1.11. Ciclo de la S-adenosil-metionina y ruta de biosíntesis de los alcaloides derivados de purina. ....	24
Figura 1.12. Estructura de la CS y superposición de la TS y CS.....	27
Figura 1.13. Evolución de la biosíntesis de cafeína . ....	28
Figura 1.14. Estrategia experimental. ....	34
Figura 2.1. Curva de calibración con el estándar de cafeína por HP-TLC .....	38

---

Figura 2.2. Cromatografía de capa fina que muestra la separación e identificación de la cafeína en extractos generados de células de <i>C. arabica</i> L. de 14 días de cultivo.....	40
Figura 2.3. Patrón de absorbancia de una muestra estándar de cafeína. ....	41
Figura 2.4. Curva de cultivo y niveles de cafeína en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L. ....	42
Figura 2.5. Efecto del $AlCl_3$ en el crecimiento de las suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L. ....	44
Figura 2.6. Niveles de cafeína en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L. ....	45
Figura 2.7. Efecto de 500 $\mu M$ de $AlCl_3$ en los niveles endógenos y exógenos de cafeína en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L. ....	47
Figura 3.1. Curva estándar de proteínas con albúmina sérica bovina como estándar.....	53
Figura 3.2. Efecto del $AlCl_3$ en la actividad enzimática <i>In vitro</i> de la CS en células de <i>C. arabica</i> L. ....	56
Figura 4.1. Secuencia del gen que codifica a la CS. ....	62
Figura 4.2. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de proteínas con actividad N-metiltransferasa ....	63
Figura 4.3. Extracción de ARN total en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L. ....	66
Figura 4.4. Amplificación de gen de CS a partir del ADNc obtenido en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> L. ....	68
Figura 4.5. Efecto del $AlCl_3$ en el nivel de transcritos de la CS en células de <i>C. arabica</i> L. ....	69
Figura 4.6. Análisis de expresión del gen de la CS mediante RT-qPCR. ....	70
Figura 5.1. Modelo propuesto del efecto que produce el estrés por $Al^{3+}$ en la ruta de biosíntesis de cafeína en células de <i>C. arabica</i> L. ....	76

---

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Taxonomía del cafeto.....	3
Cuadro 1.2. Composición de los granos de café tostado .....	7
Cuadro 1.3. Áreas territoriales del mundo que presentan suelos de tipo ácido .....	11
Cuadro 1.4 Contenido de cafeína en alimentos y bebidas. ....	18
Cuadro 1.5. Identificación de genes que codifican a la cafeína sintasa (CS) y a la teobromina sintasa (TS) en especies de <i>Coffea canephora</i> y <i>Coffea arabica</i> .....	29
Cuadro 2.1. Contenido de cafeína en hojas y células de <i>C. arabica</i> L mantenidas bajo diferentes condiciones de cultivo .....	41
Cuadro 3.1.Comparación de la actividad enzimática <i>in vitro</i> en diferentes tejidos de plantas.....	55
Cuadro 4.1. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la CS .....	63
Cuadro 4.2. Ubicación de los iniciadores diseñados que corresponde al dominio N-metiltransferasa de la cafeína sintasa.....	64
Cuadro 4.3 Iniciadores utilizados para la amplificación del gen de la CS y el gen de la tubulina por la PCR en este estudio.....	65



---

## ABREVIATURAS

2-4 D	Ácido diclorofenoxiacético
6-BAP	6-bencil amino purina
AC	Adenil ciclasa
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosina-5'-difosfato
ALMTs	Trasportadores iónicos de malato
ALS1	Transportador sensible al aluminio
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AS	Ácido salicílico
ATP	Adenosína-5' - trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
CS	cafeína sintasa
DE	Error estándar
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
GABA	ácido -aminobutírico
G-CPR	Receptor de membrana acoplado a proteína

---

## G

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HP-TLC	Cromatografía de capa fina de alta resolución
MATEs	Transportadores iónicos de citrato
MS	Murashige-Skoog
MXM	Metilxantosina nucleosidasa
MXN	Metilxantosina sintasa
Na <sub>2</sub> EDTA	Etilendiamina tetracético disódico
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NIPs	Proteínas semejantes a la nodulina
Nrat1	Proteína de macrófago asociada con la resistencia natural
NSD	Inosina-guanosina nucleosidasa
OA	Ácidos orgánicos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
PKA	Proteína cinasa A
PPVP	Polivinilo polipirrolidona

---

PRPP	5'-fosforibosil-1-difosfato
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
SNC	Sistema nervioso central
Tb	Teobromina
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TLC	Cromatografía de capa fina
Tris-HCl	Trizma clorhidrato
TS	Teobromina sintasa
UMA	Unidades de masa atómica
UV-VIS	Espectrofotometría ultravioleta-visible
VALT1	Transportado de aluminio vacuolar
XDH	Xantosina deshidrogenasa

---

## RESUMEN

La toxicidad por aluminio en plantas se presenta como uno de los principales problemas que afectan el crecimiento y el desarrollo de los cultivos que se llevan a cabo en suelos de tipo ácido. El principal efecto que produce este metal es la inhibición del crecimiento de la raíz, por lo cual se ve afectada la toma de nutrientes y de agua en el suelo. El cafeto (*Coffea arabica* L.) es un cultivo que se encuentra principalmente confinado en suelos de tipo ácido, en estas condiciones los aluminosilicatos presentes en el suelo incrementan la disponibilidad del aluminio libre ( $Al^{3+}$ ), el cual genera estrés en las plantas.

En reportes previos se ha demostrado que el estrés por aluminio en las plantas puede incrementar la acumulación de metabolitos secundarios de interés comercial. En nuestro modelo de estudio de suspensiones celulares de *C. arabica* L. sensibles a la toxicidad por aluminio, se estudió el efecto que genera el  $AlCl_3$  en la ruta del metabolismo secundario, principalmente enfocada en la biosíntesis de la cafeína (1, 3, 7- trimetilxantina). Nuestros resultados indicaron que las células mantenidas en radiación luminosa presentaron las mejores condiciones de cultivo para el estudio de la biosíntesis de cafeína, en comparación a las células mantenidas en oscuridad. También se demostró que las células expuestas durante un curso temporal de 10 horas de exposición con  $500 \mu M$  de  $AlCl_3$ , incrementaron los niveles endógenos y exógenos de cafeína, en un 62% y en un 30% respectivamente. Por otra parte, durante este tiempo de exposición se observó que el  $AlCl_3$  incrementó la actividad enzimática de la cafeína sintasa (CS) y el nivel de transcritos del gen que codifica esta enzima (*CCS1*). Estos resultados sugirieron que la biosíntesis de cafeína se regula a nivel transcripcional cuando las células son expuestas al estrés por  $AlCl_3$ .

---

---

## ABSTRACT

Aluminum toxicity in plants is a growth-limiting factor in plants cultivated in acidic soils. In these conditions, the presence of aluminosilicates in the soil increase the availability of free aluminum ( $\text{Al}^{3+}$ ). This consequently generates stress in plants. The main effect of Al is inhibiting of root growth, which affects nutrient and soil water uptakes. Coffee tree (*Coffea arabica* L.) is grown in acidic soil which frequently present condition for aluminum toxicity.

In previous reports, it has been demonstrated that aluminum's stress in plants can increase the accumulation of secondary metabolites of commercial interest. Therefore, the aim of this project was to study the relationship between  $\text{AlCl}_3$  stress and caffeine biosynthesis (1, 3, 7- trimethylxanthine), using as a model *in vitro* cell suspension of *C. arabica* L. sensitive to aluminum toxicity. Our results indicated that cells grown and maintained in light were the best conditions for the study of caffeine biosynthesis compared to cells maintained in the dark. Results also suggested, that exposure to cell with  $\text{AlCl}_3$  500  $\mu\text{M}$  in a time course for 10 hours resulted in an increased in caffeine levels, recovered both in cell (62%) and in spent medium (30%). This increase coincided with an increase in the enzyme activity of caffeine synthase (CS) as well as the level of transcripts of the gene encoding this enzyme (CCS1). Finally, we propose that caffeine biosynthesis is regulated at the transcriptional level when cells are exposed to stress of  $\text{AlCl}_3$ .

---

## INTRODUCCIÓN

Con más de 2.25 millones de tasas de café consumidas a diario, el cafeto es uno de los cultivos más importantes en la tierra, siendo cultivado en más de 11 millones de hectáreas de suelo arable (Denoued *et al.*, 2014). La especie de cafeto que más se comercializa a nivel mundial es el género de *Coffea arabica* L. debido a las propiedades organolépticas que la caracterizan de las demás (Alvarado y Rojas, 2007). Entre los compuestos que presenta el cafeto, la cafeína es la mejor conocida y la que se estudia comúnmente debido a los efectos fisiológicos que produce en los humanos (Perrois *et al.*, 2014).

Existe una estimación que ha indicado que alrededor del 40-50% de las tierras cultivables en el mundo son ácidas, aproximadamente el 60% de los suelos ácidos se encuentran en los trópicos y subtrópicos donde se lleva a cabo el cultivo del cafeto (Hede *et al.*, 2001). En los suelos ácidos la toxicidad por el aluminio (Al) se presenta como un factor primario que reduce los rendimientos de los cultivos de interés agrícola; a valores de pH menores a 5 en el suelo, los iones  $Al^{3+}$  se disuelven de los minerales de arcilla y son bastante tóxicos para las raíces de las plantas, inhibiendo su crecimiento y su función (Kochian *et al.*, 2015).

El aluminio es un metal que se considera tóxico para la mayoría de las plantas, se han reportado numerosas investigaciones donde se analizaron los efectos que produce este metal en las plantas (Liu *et al.*, 2009; Martínez-Estévez *et al.*, 2003). Uno de los efectos principales que produce el Al a niveles micromolares es la disminución de la elongación de la raíz (Famoso *et al.*, 2010); además de producir cambios en el fenotipo, el Al produce cambios bioquímicos a nivel intracelular. Una de las principales estrategias que la planta utiliza para disminuir el efecto tóxico del aluminio, es la exudación de ácidos orgánicos a través del sistema radicular (Liu *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que el  $AlCl_3$  tiene un efecto positivo en la acumulación de los alcaloides del tropano, el uso del Al en un modelo *in vitro* de plántulas de *Datura innoxia* indicó que este metal puede incrementar los niveles de hiosciamina y escopolamina en las raíces (Karimi y Khataee, 2012). En las suspensiones celulares de *C. arabica* se ha demostrado que el aluminio puede disminuir el crecimiento celular (Muñoz-Sánchez *et al.*, 2013), pero aún se desconoce a nivel intracelular que cambios puede

generar en las vías del metabolismo secundario.

En el presente proyecto de investigación se estudió la relación entre el estrés por aluminio y la ruta de biosíntesis de cafeína en un modelo *in vitro* de suspensiones celulares de *C. arabica* L. Este trabajo aportó conocimiento sobre los cambios bioquímicos que genera este factor abiótico en los niveles de acumulación de cafeína, también en la actividad enzimática de la cafeína sintasa y el nivel de transcritos de gen que codifica esta enzima.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1. EL CAFETO

##### 1.1. EL ORIGEN Y LA TAXONOMÍA DEL CAFETO

El cafeto (planta de café) tiene sus orígenes en un territorio de Etiopía de África Oriental, llamado *Kaffa*, de cuyo nombre se deriva el nombre de café. Las semillas aromáticas que producía el arbusto de cafeto fueron llevadas a la península de Arabia por marineros africanos, donde posteriormente sería cultivada (Vieira, 2008).

El cafeto pertenece a la familia de las *Rubiáceas* (Cuadro 1.1), establecido por Linnaeus en 1737. En el año de 1947 Auguste Chavalier reconocido como el gran autor de la taxonomía del café, publicó una monografía con el título de “Les Caféiers du Globe” donde se mencionan 66 especies diferentes que fueron organizadas según su lugar de origen, así fueron generados 4 grupos entre los que se mencionan *Eucoffea*, *Paracoffea*, *Argocoffea* y *Mascarocoffea*; en la sección de *Eucoffea* se hallan los géneros de *Coffea arabica*, *Coffea Canephora*, *Coffea liberica* y *Coffea dewevrei* (Meyer, 1965), siendo el género de *C. arabica* la más comercializada a nivel mundial y seguidamente las otras especies en el orden antes mencionado (Alvarado y Rojas, 2007).

**Cuadro 1.1** Taxonomía del cafeto

Taxonomía	Nombre
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Sub-división	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliata</i>
Sub-clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Especie(s)	<i>C. árabica</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. liberica</i> , etc.

El cafeto es un cultivo de trascendencia cultural y ecológica. Su universalidad corresponde al ritmo de la diseminación del cultivo y al consumo de los países que lo industrializaron. El mercado del café ha sido históricamente dinámico y complejo, debido a la marcada regionalización entre las fuerzas de la oferta y la demanda, la enorme variación del precio, los cambios naturales, diferencias tecnológicas de producción, cambios sociales en los países productores y presiones políticas entre los países productores y consumidores (Contreras *et al.*, 2008).

## **1.2. BIOLOGÍA DEL CULTIVO DE CAFETO**

En el continente africano, el cafeto es un arbusto que puede alcanzar una altura de 12 a 14 metros; sin embargo, en la zona cafetalera de América solo alcanza entre los 4 a 6 metros de altura; la edad de una planta de cafeto puede llegar hasta los 50 años (Echeverri *et al.*, 2005).

La planta de cafeto (Figura 1.1) posee flores hermafroditas y regulares de color blanco, la floración de la especie de *C. arabica* es marcadamente estacional, efectuándose generalmente solo con la presencia de tiempo húmedo, pero la periodicidad puede tener menor diferencia en condiciones climáticas que son relativamente estables todo el año. La cantidad de flores producidas y su tamaño dependen de las relaciones de agua prevalecientes. Las condiciones extremadamente húmedas pueden ocasionar la formación de distintas flores estériles de color verdoso, llamadas “flores-estrella” (INFOAGRO, 2002). Las flores son bastante grandes, olorosas y de color blanco, generalmente están reunidas en una axila de las hojas.

El fruto del cafeto es una drupa esférica más o menos carnosa, es de forma ovoide y tiene de 8 a 16 mm de largo y 7 a 12 mm de ancho, la cereza es roja cuando está madura, las semillas son ovoides, con una cara plana, de dimensiones variables, pero generalmente pequeñas (Pérez, 1997). La semilla se compone de un albumen cornea de color plomoso opaco, está rodeada de una doble envoltura perfectamente adherida al albumen. Suele desarrollarse sólo un ovulo y entonces el grano único es convexo por toda la periferia y ocupa casi el centro del fruto (Díaz, 2011).

Las hojas del cafeto son opuestas, raras veces ternadas, acompañadas de estipulas interpeciolares (ó intrapeciolares); conadas en vaina en una extensión variable y generalmente acuminadas; a veces adquieren una apariencia corrugada, ondulante, oblonga, elíptica, cortas, acuminadas, redondeadas o ampliamente acunadas en su base, de 15-30 cm de largo y 5-15 cm de ancho (Da Silva *et al.*, 2004).

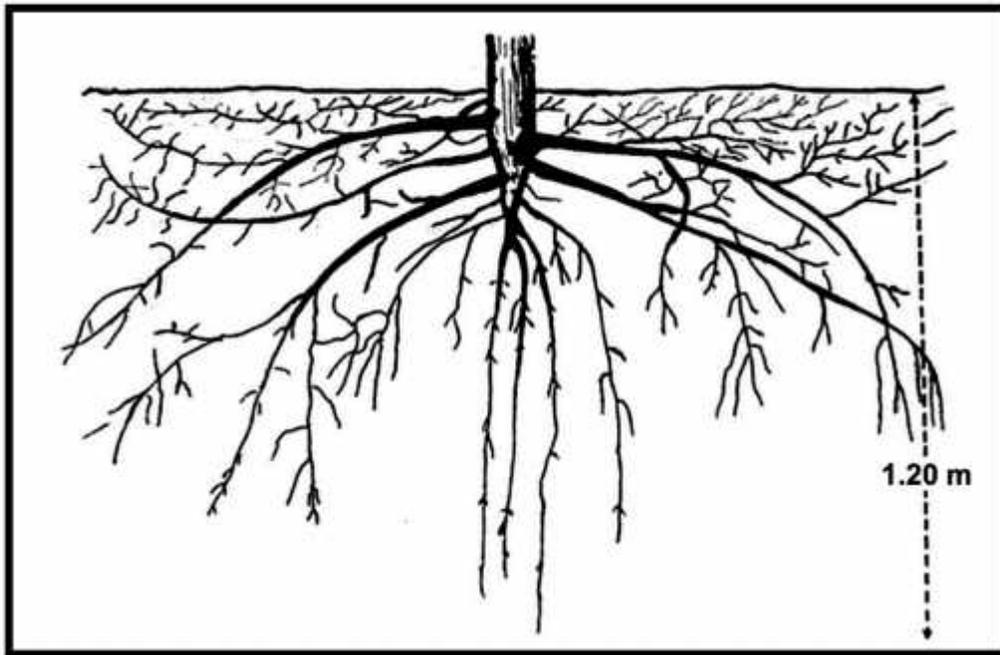


**Figura 1.1** Planta de cafeto (*Coffea*), (Tomado de plant curator, 2014).

En cuanto al sistema radicular, la planta de cafeto presenta los siguientes tipos de raíz: pivotante, axilar, lateral y raicilla (Figura 1.2). La pivotante es la raíz principal del arbusto, que penetra verticalmente en el suelo, pudiendo alcanzar una profundidad en una planta adulta de 50 a 60 cm de longitud (Berríos, 1983).

De los géneros de *Coffea* más comercializados, el género de *C. arabica* es la más apreciada y crece en alturas entre 900 y 2,000 metros sobre el nivel del mar. Su contenido de cafeína es relativamente bajo (entre 0.9% y 1.5%) (Imaginalgo, 2016). Su cultivo es más delicado y requiere mayores cuidados; sus frutos son redondos, suaves, levemente agrios, de color oscuro, de corteza lisa e intenso aroma. El cafeto para su buen

desarrollo necesita de condiciones climáticas específicas para crecer, requiriendo de un microambiente que le proporcione suficiente agua, humedad y luz solar. Hoy en día se cultiva en los países tropicales y subtropicales cercanos a la línea del Ecuador (Aspiazu *et al.*, 2009).



**Figura 1.2** Estructura típica del sistema radical de un cafeto adulto (Barríos, 1983).

### 1.2.1 Composición del café

Los granos de café de las especies *C. arabica* y *C. canephora* tienen la composición que se describe en el Cuadro 1.2. En el café tostado se han identificado más de 700 sustancias volátiles, las cuales corresponden cerca del 0.1% del total de la materia seca (Nishimura y Mihara, 1990). Las características químicas y el aroma de los constituyentes volátiles del café han sido motivo de importantes estudios; se conocen cientos de aromas, que según los expertos superan las del vino (Shimoda y Shibamoto, 1990). El café también posee gran cantidad de contaminantes y sus concentraciones dependen de múltiples factores que intervienen en la selección, preparación y tostado del grano. Entre estos contaminantes se encuentran las parafinas y micotoxinas (Grob *et al.*, 1990; Terada *et al.*, 1985).

**Cuadro 1.2** Composición de los granos de café tostado (Porcentaje en base seca) (Viani, 1991)

Componentes	Especie	
	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>
Cafeína	1.3%	2.4%
Minerales	4.5%	4.7%
Proteínas	10%	10%
Ácidos alifáticos	2.4%	2.5%
Ácidos clorogénicos	2.7%	3.1%
Carbohidratos	38%	41.5%
Lípidos	17%	11%
Trigonellinas	1%	0.7%
Aromas Volátiles	0.1%	0.1%
Melanoidinas	23%	23%

### 1.3 EL CAFETO EN MÉXICO

México es un país que en los últimos 200 años ha adquirido experiencia y conocimientos en el cultivo del cafeto y en su producción, por lo anterior no es novedoso encontrarlo como uno de los principales países productores de café, además de ser un país líder en la producción de café de tipo orgánico (Escamilla *et al.*, 2005). Originaria de África Oriental, la planta de cafeto llegó a nuestro país en el año de 1796 a la región de Córdoba, Veracruz. En México el cultivo y consumo de café como bebida data de la última década del siglo XVIII; después de su introducción, el grano ha sido considerado uno de los cultivos de mayor importancia económica, sociocultural y ambiental (Pérez y Díaz, 2000).

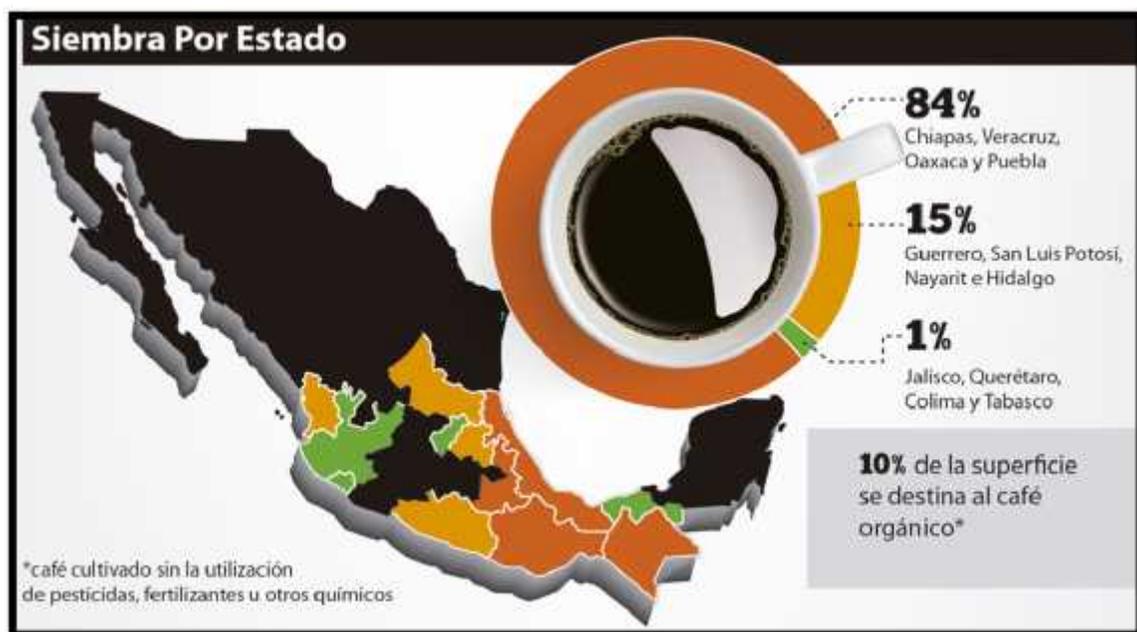
Existen dos especies de cafeto que se cultivan en el país: *C. arabica* y *C. canephora*. Aproximadamente el 98% de los cafetos son variedades arábicas como la Bourbon, Caturra, Maragoginpe, Mundo Novo, Garnica y Typica; siendo esta última la que predominaba en México hasta hace poco; sin embargo, actualmente se está reemplazando por variedades de porte bajo y mayor producción como la Catimor y Catuai. Cada variedad posee diferencias de calidad, volumen producido, rendimiento,

resistencia a las plagas y a las enfermedades, aroma, acidez, entre otros (Escamilla *et al.*, 2005).

La roya es una de las enfermedades más comunes que afecta el cultivo de cafeto (*Hemileia vastratix*), esta es causada por un hongo que ingresó al país en 1981. La espora de este hongo es muy resistente y puede transportarse por corrientes de aire o adherida a cualquier objeto, teniendo una germinación en condiciones ideales de sólo tres horas. En épocas de lluvias ligeras se puede observar la afección en el cultivo.

El cultivo del cafeto se extiende alrededor de 12 estados de la República Mexicana, agrupados en cuatro grandes regiones que van desde la frontera sur que colinda con Guatemala, hasta el estado de Nayarit en el pacífico Norte. El cultivo de café en México, se concentra en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla, que producen cerca del 84% del total nacional de café verde, mientras que el porcentaje restante se distribuye en ocho entidades (Figura 1.3). México ocupa el sexto lugar entre los países de mayor producción de café, su aportación es de un 3% de la producción después de Brasil, Colombia, Vietnam, Indonesia, India y Etiopía. La superficie cafetalera de México abarca 690,000 hectáreas distribuidas entre 500,000 cafeticultores (AMECAFÉ, 2013).

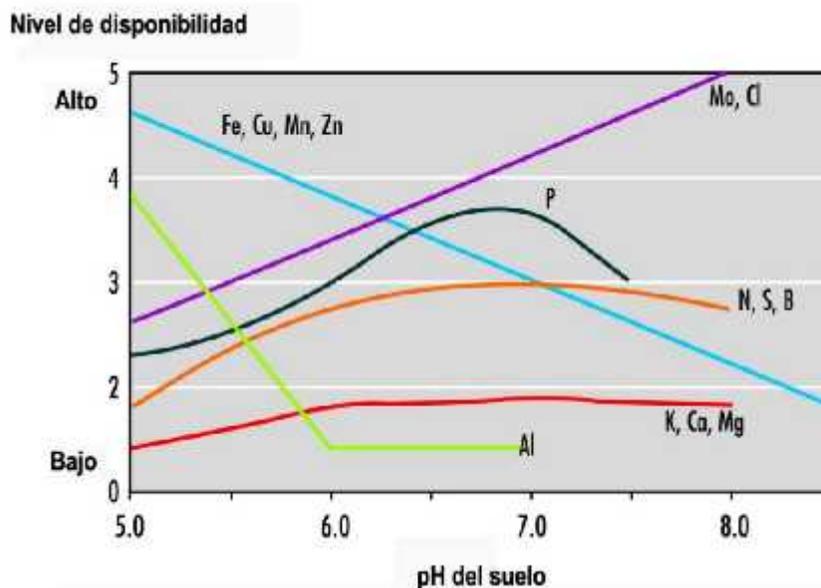
La producción de café orgánico en México inició hace más de 50 años con la experiencia de la Finca Irlanda en el Soconusco en Chiapas, pero es hasta la crisis cafetalera del 1989-1994 cuando se consolida la producción orgánica al ser retomada por las organizaciones cafetaleras, debido a que esta actividad se caracteriza por incluir los conocimientos de la caficultura tradicional, evita el uso de insumos sintéticos procedentes del exterior e intensifica el uso de la mano de obra, bajo normas y reglamentos establecidos por agencias certificadoras (Roozen y VanderHoff, 2002). En México, la producción de café se realiza bajo diferentes condiciones climáticas, dando origen a numerosas variedades y calidades, así como a distintos períodos de floración y fructificación, condiciones que hacen necesaria la recolección manual de la cereza. La cosecha se realiza de septiembre a abril, y se realizan de dos a tres cortes por ciclo, esta actividad es muy demandante de la mano de obra para la recolección y en México participan los grupos familiares enteros (Nájera, 2002).



**Figura 1.3** Entidades federativas productoras de cafeto en México (AMECAFÉ, 2013).

#### 1.4 LOS SUELOS ÁCIDOS

La acidez del suelo es un factor que limita la producción de los cultivos de interés agrícola (Matonyei *et al.*, 2014); ya que ocupan aproximadamente del 30-40% de los suelos arables del mundo y se caracterizan por tener un pH igual o menor a 5.5. El proceso natural de acidificación es frecuentemente intensificado por prácticas agrícolas, en particular debida a la fertilización y a la precipitación de lluvia ácida (Rao *et al.*, 1993). Aunque la baja fertilidad de los suelos ácidos se debe a una combinación de toxicidades minerales (aluminio y manganeso) y deficiencias (fósforo, calcio, magnesio y molibdeno), la toxicidad del aluminio es el factor más importante, siendo un obstáculo para la producción de cultivos en el 67% total de la superficie del suelo ácido (Hede *et al.*, 2001). Algunos elementos influenciados por el pH, son los nutrimentos esenciales para las plantas, por lo cual un cambio en el pH del suelo, puede afectar la nutrición de los cultivos (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Relación entre el cambio del pH en el suelo y los niveles de disponibilidad de diferentes elementos presentes en el suelo. La línea marcada en color verde muestra que el Al incrementa su disponibilidad en el suelo cuando el pH es menor a 6 (Goedert *et al.*, 1997).

A valores de pH inferiores a 5, los iones  $Al^{3+}$  se disuelven a partir de minerales de arcilla y son bastante tóxicos para las raíces de las plantas, inhibiendo el crecimiento y la función de la raíz (Kochian *et al.*, 2015). Esto a su vez conduce a un menor rendimiento de los cultivos debido a las deficiencias de los minerales y a la sequía. Aproximadamente el 60% de los suelos ácidos se encuentran en los trópicos y subtrópicos (Figura 1.5). Debido a que muchos países en desarrollo se encuentran en la mayoría de los suelos ácidos, la toxicidad por aluminio limita la producción de cultivos en aquellas partes del mundo donde la seguridad alimentaria es más débil (Cuadro 1.4), incluyendo países como Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos y Brasil (Von Uexküll y Mutert, 1995). En muchos países, los suelos ácidos constituyen una limitante para el cultivo de plantas comestibles como el maíz y el arroz (Masulili *et al.*, 2010).

En México, 7.5 % de la superficie total de país (14.7 millones de hectáreas) poseen suelos con pH igual o menor a 6.5, el área bajo cultivo con suelos ácidos es aproximadamente 14% de superficie total dedicada a la silvicultura, a la ganadería y a la agricultura (Zetina *et al.*, 2002). En general, la producción de cultivos básicos y cultivos de cereales son afectadas por los suelos ácidos (Ma *et al.*, 2001).

Se ha demostrado la relación entre el pH y el contenido de aluminio presente en los suelos de Yucatán y Veracruz. El suelo de Yucatán presentó un pH alcalino de 8 y el contenido de  $\text{Al}^{3+}$  fue de  $0.21 \text{ cmol kg}^{-1}$ , estos niveles fueron bajos en comparación a los del suelo de Veracruz, el cual presentó  $2.76 \text{ cmol kg}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  a un pH de 3.6. Se demostró así, la relación inversa entre el contenido de  $\text{Al}^{3+}$  y el pH del suelo (Muñoz-Sánchez *et al.*, 2015).

**Cuadro 1.3** Áreas territoriales del mundo que presentan suelos de tipo ácido (Hede *et al.*, 2001).

Región	Área (%)
África	16.7
Australia y Nueva Zelanda	6.1
Europa	9.9
Asia	26.4
América	40.9
Total	100



**Figura 1.5** Suelos ácidos en el mundo. Las áreas de predominancia se destacan en color naranja (Hede *et al.*, 2001).

## 1.5 EL ALUMINIO

Han pasado más de doscientos años desde que el aluminio fue usado por primera vez, cuando el químico inglés Humphry Davy pudo producirlo en el año de 1807 (Kvande, 2008); no fue hasta el año de 1825 cuando Hans Christian Orsted pudo aislarlo en forma pura como  $AlCl_3$ . El peso atómico del aluminio es de 26.9815 UMA, es un metal altamente electropositivo y extremadamente reactivo (Poschenrieder y Barceló, 2013), es sólido y en condiciones normales es de color blanco plateado, dúctil, maleable y cristaliza en forma cúbica. La química del aluminio es bastante compleja, debido a su carga iónica y su pequeño radio atómico que es capaz de reaccionar con otros metales que se encuentran solubles en el suelo. El aluminio es el metal más abundante en la tierra (8.3 % en peso); es excedido en abundancia solo por el oxígeno (45.5 %) y el silicio (25.7 %), y es cercano al hierro (6.2%) y al calcio (4.2%) (Branquinho *et al.*, 2007; Greenwood y Earnshaw, 1997).

En investigaciones recientes, se ha descubierto que el aluminio está relacionado con procesos patológicos importantes, debido a que es un agente neurotóxico que en el hombre y en animales degenera fibrillas nerviosas en el cerebro, por lo que es relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson (Zhang *et al.*, 2016). Por otra parte, el aluminio es un fuerte limitador del crecimiento en las plantas y provoca pérdidas en el sector de la agricultura, es por ello que sus efectos fitotóxicos han sido estudiados desde principios del siglo XX (Foy, 1984).

### 1.5.1 Efecto del aluminio en plantas

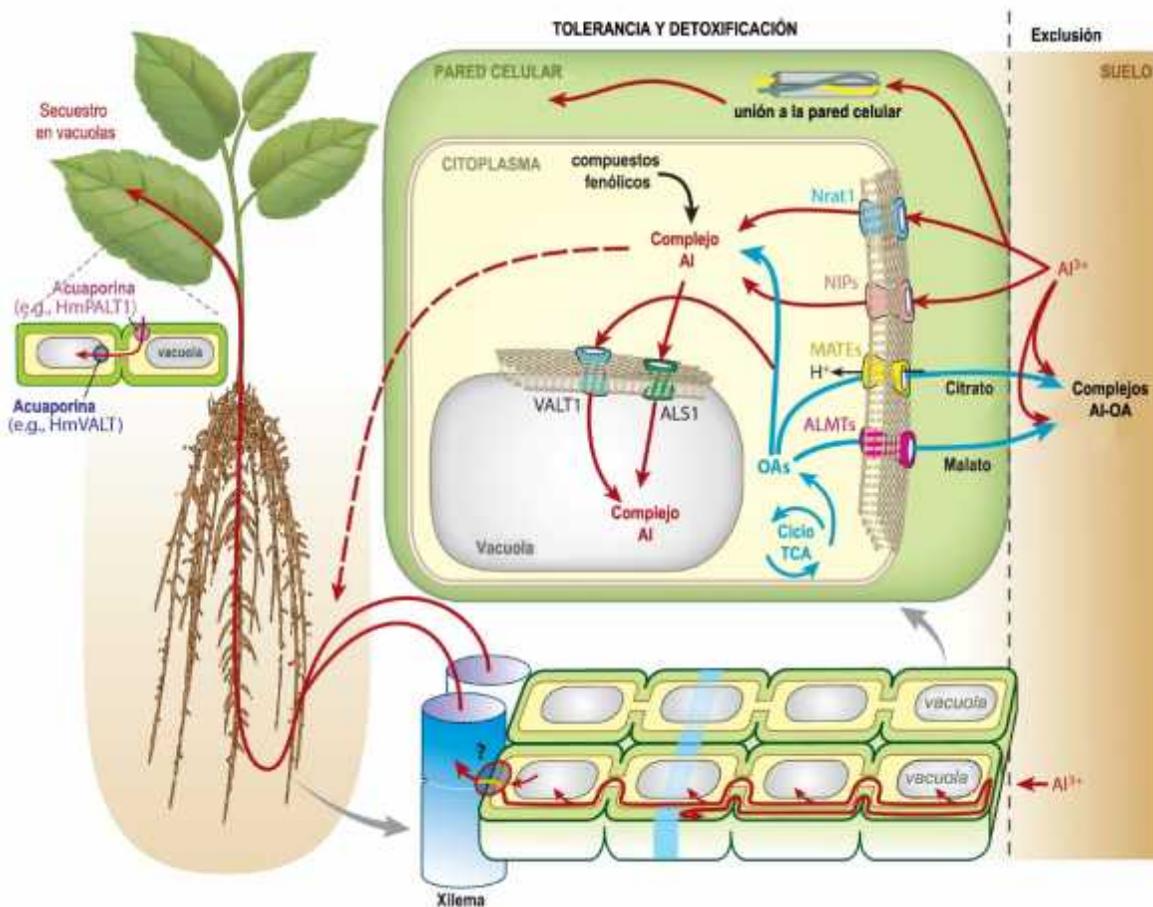
Los seres vivos están a menudo expuestos a condiciones ambientales adversas (Figura 1.6). La mayoría de los animales pueden escapar de tales condiciones por el movimiento o la migración, pero organismos sésiles, tales como plantas superiores sólo tienen posibilidades limitadas de evitar tales condiciones (Sreenivasulu *et al.*, 2007; Madlung y Comai, 2004).



**Figura 1.6** Las plantas están expuestas a diferentes factores de estrés en el medio ambiente que los rodea (Shamsi *et al.*, 2013).

La toxicidad por aluminio en plantas es uno de los mayores problemas en el crecimiento y el desarrollo de cultivos. La liberación de ácidos orgánicos es un importante mecanismo de tolerancia para las plantas contra la toxicidad por el Al. Muchas plantas excretan ácidos orgánicos en respuesta al estrés por aluminio, como el citrato liberado de las raíces de maíz (Pineros *et al.*, 2002) y la soya (You *et al.*, 2010), el oxalato en el alforfón (Ma *et al.*, 1997), y el malato en plantas transgénicas de tabaco (Chen *et al.*, 2013). Sin embargo, aún falta por esclarecer cómo se regula la excreción de los ácidos orgánicos por el aluminio (Ryan *et al.*, 2001).

Uno de los principales mecanismos de resistencia al aluminio es el que involucra la exclusión del aluminio de la raíz mediante complejos con ácidos orgánicos (OA) que son exudados de la raíz, en donde se pueden activar transportadores iónicos de malato (ALMTs) o citrato (MATEs) a través de la membrana celular en respuesta al aluminio (Ryan *et al.*, 2009). Los mecanismos de detoxificación interna del aluminio involucran el flujo del  $\text{Al}^{3+}$  a través de la membrana plasmática dentro del citoplasma, en donde el aluminio es quelado por ácidos orgánicos o compuestos fenólicos (Li *et al.*, 2014; Tolrá *et al.*, 2009). El aluminio también puede ser transportado dentro de la vacuola, posiblemente por la vía de transportadores de acuapurinas (Negishi *et al.*, 2012), (Figura 1.7).



**Figura 1.7** Modelo de una célula radicular en donde se ilustran los mecanismos de resistencia y detoxificación en respuesta al aluminio. Las flechas en color rojo muestran el flujo del aluminio y en azul el flujo de los ácidos orgánicos (OA). El aluminio es transportado al citoplasma ó a la vacuola mediante la activación de transportadores de aluminio. Nrat1, proteína 1 de macrófago asociada con la resistencia natural; NIPs, proteínas semejantes a la nodulina 26; VALT1, transportador de aluminio vacuolar; ALS1, transportador sensible al aluminio; TCA, ciclo de los ácidos tricarbónicos (Modificado de Kochian *et al.*, 2015).

Cuando el pH del suelo es mayor a 5.5, la concentración de aluminio en la solución del suelo suele ser menor a 37  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, cuando el pH disminuye, el aluminio es liberado de los minerales de aluminosilicatos y su concentración suele aumentar (Marschner, 2012). El aluminio puede estar presente en el suelo en diferentes formas según el pH que este tenga; cuando las condiciones del suelo presentan un pH de 7.0, el aluminio se encuentra en forma de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  mineral conocido como gibsita. En soluciones

alcalinas ( $\text{pH} > 8$ ) el aluminio adopta la forma aniónica  $\text{Al}(\text{OH})_4^-$  o aluminato (Poschenrieder *et al.*, 2008) y en condiciones ácidas ( $\text{pH} < 5$ ) los aluminosilicatos liberan el  $\text{Al}^{3+}$  que se considera la especie más tóxica en plantas (Liu *et al.*, 2009).

El principal efecto del aluminio sobre el desarrollo vegetal es la inhibición del crecimiento de las raíces (Chen *et al.*, 2014), lo cual afecta la toma de nutrientes y agua del suelo. Se ha observado que el aluminio puede bloquear el ciclo celular de los meristemos apicales de las raíces, ya que por la carga química del aluminio, este puede asociarse a los grupos fosfato del ADN e inhibir el proceso de replicación (Rout *et al.*, 2001).

En general, el aluminio produce síntomas parecidos a los producidos por deficiencia de fósforo, en estas condiciones las plantas presentan hojas pequeñas de color verde oscuro, maduración tardía, amarillento y muerte de los ápices de las hojas; en otros casos la planta puede presentar síntomas similares a los que se generan por deficiencia de calcio donde se produce el enrollamiento de las hojas jóvenes y el colapso de meristemos (Ozyigit *et al.*, 2013).

### **1.5.2 Estudio del aluminio en cultivos *in vitro***

En los últimos años se han utilizado los cultivos *in vitro* de tejidos de plantas para llevar a cabo estudios sobre la toxicidad por aluminio, mismos en los que se ha podido entender los principales mecanismos y estrategias que las plantas emplean en la tolerancia a niveles potencialmente tóxicos de este metal en el suelo. Entre los sistemas más utilizados para determinar el efecto que produce el aluminio en el café se utilizan los cultivos *in vitro* de células y tejidos de *C. arabica* L. (Bazzo *et al.*, 2013; Valadez-González *et al.*, 2007).

Por otra parte, el aluminio ha sido utilizado como un factor abiótico que puede incrementar la producción de metabolitos secundarios de interés comercial (Karimi y Khataee, 2012). En un estudio a nivel *in vitro* donde se expusieron las raíces de *Brugmansia candida* se ha podido observar el incremento de la escopolamina, un alcaloide que se emplea en la medicina como agente anticolinérgico (Spollansky *et al.*, 2000). Así mismo, se ha observado que el aluminio puede inducir la biosíntesis de una fitoalexina, conocida como resveratrol, en un cultivo *in vitro* de grapevine (*Vitis vinifera*), compuesto que se sintetiza

en la planta como respuesta de defensa frente a patógenos, en experimentos con ratas se ha reportado que este metabolito secundario tiene efectos anticancerígenos, antienvjecimiento, antiinflamatorios, antifibrótico, hipocolesterolemiante, y otros beneficios cardiovasculares (Bejan *et al.*, 2011).

## **1.6 EL METABOLISMO SECUNDARIO EN PLANTAS**

Las plantas además de poseer un metabolismo primario como el que se presenta en todos los organismos vivos, incluyen un metabolismo secundario que les permite sintetizar compuestos de diversa naturaleza química (Dixon, 2001). En este metabolismo se generan productos secundarios que no presentan una función definida en los procesos requeridos para el funcionamiento del organismo que los produce, es decir; que no participan en los procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes, o en las rutas metabólicas de los carbohidratos o lípidos. Otra característica de los metabolitos secundarios es que tienen una distribución restringida en el reino vegetal, y algunos solo se encuentran en una especie vegetal o grupo de especies (Taiz y Zeiger, 2007).

La producción de los metabolitos secundarios es considerada una de las estrategias que puede llevarse a cabo en las plantas como respuesta de defensa frente a condiciones de estrés biótico o abiótico. Estos metabolitos presentan funciones ecológicas ya que participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente (Matsuura y Fetto-Neto *et al.*, 2015).

Los metabolitos secundarios se pueden clasificar en familias, las más importantes son (Bourgaud *et al.*, 2001):

- Los terpenoides: esteroides
- Los compuestos nitrogenados: alcaloides
- Los compuestos fenólicos: antocianinas, flavonoides y taninos

Las plantas producen un amplio rango de metabolitos secundarios, los cuales después de producirse son extraídos y son empleados en fármacos, agroquímicos, aromas, pigmentos, pesticidas, y aditivos para alimentos (Karuppusamy, 2009; Peña, 2011).

### 1.6.1 Estudio del metabolismo secundario en cultivos *in vitro*

Los cultivos *in vitro* de células vegetales en suspensión o inmovilizadas tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios, por lo que cualquier producto presente en la planta puede ser sintetizado en este sistema bajo condiciones apropiadas de incubación (Häkkinen *et al.*, 2012). Es por ello, que los cultivos *in vitro* se han utilizado como estrategia para el estudio del metabolismo secundario, el uso de esta técnica de cultivo es considerada como una poderosa herramienta para estudiar las rutas de biosíntesis de los metabolitos secundarios y de su regulación por las enzimas (Ashry y Mohamed, 2014).

Las suspensiones celulares presentan ventajas a nivel experimental sobre el control de parámetros como la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto; el medio de cultivo permite que los nutrientes y el oxígeno se distribuyan de forma homogénea en las células, facilitando su transferencia hacia el citoplasma (Muthaiya *et al.*, 2013; Schlatmann *et al.*, 1996). Diversos autores reportan un grado de diferenciación en la fase estacionaria del cultivo en suspensión y se observa una mayor acumulación de metabolitos secundarios durante este periodo (Murthy *et al.*, 2014; Bourgaut *et al.*, 2001).

Uno de los primeros reportes del cultivo de tejido en cafeto es el de Staritsky, (1970) quien obtuvo un rápido crecimiento de callos utilizando explantes de segmentos internodales en brotes jóvenes ortrópicos. En los años 70s se establecieron algunas de las condiciones necesarias para la formación de embriones somáticos generados de callos de hojas de *C. arabica* e inducidas con la auxina en un medio con 2,4- ácido diclorofenoxiacético y citocinina (Söndahl y Sharp, 1977). En esa misma década también se descubrió que las suspensiones celulares fueron capaces de producir altas concentraciones de alcaloides (Buchanan *et al.*, 2014). En las suspensiones celulares y plántulas de *C. arabica* se han realizado estudios sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios como la cafeína y el ácido clorogénico (Sartor y Mazzafera, 2000; Adler *et al.*, 2016).

En nuestro grupo de trabajo, se diseñó un medio de cultivo adecuado para el estudio de la toxicidad por aluminio en suspensiones celulares de *C. arabica* L. y para tal efecto, se establecieron los cultivos en un medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) a la mitad de su

fuerza iónica y un pH de 4.3. En este modelo de estudio, además de haber demostrado la disminución del crecimiento celular cuando se expusieron a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Martínez-Estévez *et al.*, 2001; Muñoz-Sánchez *et al.*, 2013), también se ha podido demostrar la acumulación de la cafeína bajo el tratamiento de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 24 horas (Pech-Kú, 2014).

## 1.7 LA CAFEÍNA

Entre más de 50,000 metabolitos secundarios en plantas, 12,000 son alcaloides. Los efectos fisiológicos de estos compuestos en herbívoros invertebrados sustentan el papel químico de defensa que producen en las plantas (Makkar *et al.*, 2007), entre estos la cafeína (1,3,7- trimetilxantina) es un alcaloide de purina (Figura 1.8), este compuesto se encuentra en bebidas populares como el café y el té (Cuadro 1.4), es muy conocido por sus propiedades estimulantes cardiacas y por su participación en el sistema nervioso central, agilizandando las funciones mentales y corporales (Nehlig, 2013).

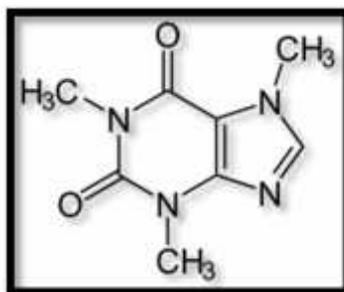


Figura 1.8 Estructura química de la cafeína.

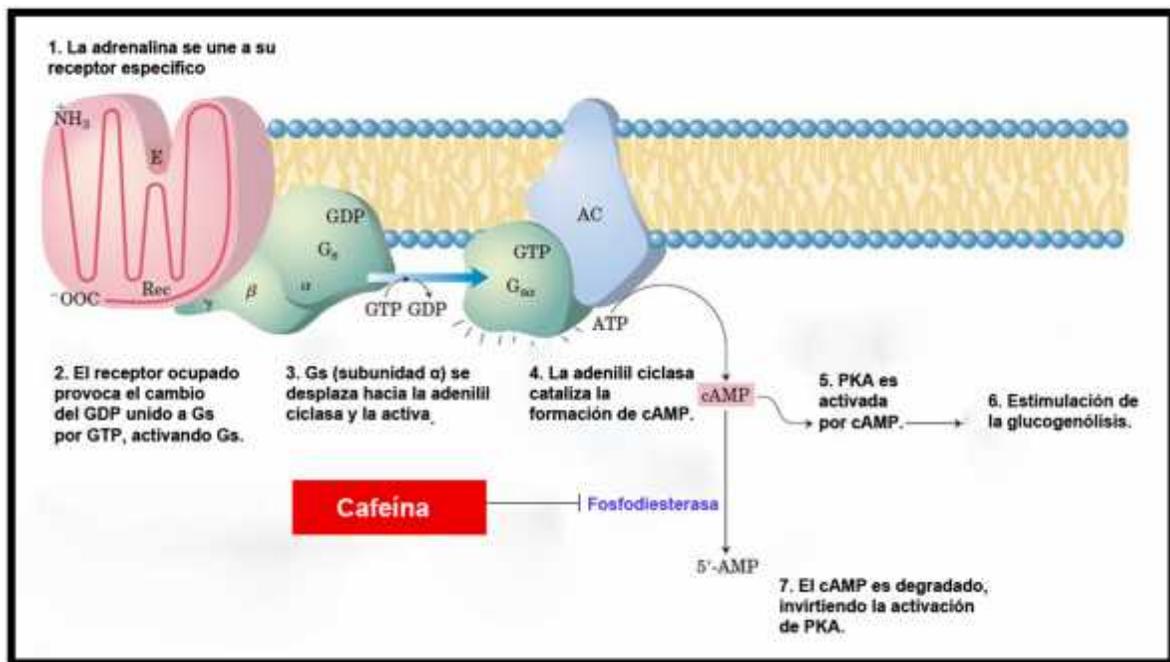
Cuadro 1.4. Contenido de cafeína en alimentos y bebidas (Nehlig *et al.*, 2013).

Alimentos y bebidas	Volumen o peso	Contenido de cafeína (mg) Media (valores extremos)
Café expreso	30 ml	40 (40-60)
Café soluble (instantáneo)	150 ml	65 (40-120)
Café descafeinado	150 ml	3 (2-5)
Té (hojas)	150 ml	40 (30-45)
Soda regular	330 ml	30-48
Soda libre de azúcar	330 ml	26-57
Chocolate blanco	30 g	6 (1-15)
Chocolate oscuro	30 g	60 (20-120)

La cafeína tiene efectos farmacológicos en diferentes sistemas del organismo humano (Burke, 2009); en el sistema nervioso central (SNC) se presenta como un psicoestimulante al aumentar el estado de vigilia y reducir la sensación de cansancio. La acción farmacológica de la cafeína en el SNC produce un incremento en el rendimiento intelectual, aumentando la capacidad de atención y produciendo una sensación de bienestar, sin embargo puede generar trastornos de ansiedad como nerviosismo, insomnio, inquietud y taquicardia (Lozano *et al.*, 2007). Se ha estimado que la dosis letal de la cafeína en humanos se encuentra entre 150 y 200 mg por Kg de peso corporal (Favrod-Coune y Broers, 2015).

El mecanismo de acción de la cafeína se basa en el bloqueo de los receptores adenosínicos A2 del SNC, se considera que la cafeína actúa como un antagonista competitivo de estos receptores, los cuales pertenecen a una familia de receptores acoplados a proteínas G. La adenosina actúa sobre el receptor A1 e inhibe la adenilil ciclasa, produciendo un estado de sedación y relajación en el SNC; por el contrario, la cafeína bloquea el receptor A1 y libera el efecto inhibitorio de la adenosina sobre la neurotransmisión, mejorando la capacidad de memoria en los humanos. A dosis altas, la cafeína bloquea los receptores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y libera  $Ca^{2+}$  intracelular. Además, por activación del sistema nervioso autónomo periférico puede causar un aumento de la secreción ácida gástrica (Górska y Golembiowska, 2015; Fredholm *et al.*, 1999).

La función metabólica de la cafeína en el organismo humano es a través de la inhibición de la enzima fosfodiesterasa (PDE), la cual hidroliza el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) intracelular; la inhibición de esta enzima produce un aumento de la vida media del AMPc que como segundo mensajero activa a una proteína cinasa A (PKA), misma que cataliza la fosforilación de muchas proteínas blanco involucradas en vías de transducción de señales, por lo cual se activan y regulan procesos como la estimulación de la glucogenólisis en respuesta a la estimulación celular y al gasto energético, esta respuesta es similar a la generada en la vía de transducción de señales por la adrenalina; sin embargo, esta hormona se une y cambia la conformación del dominio intracelular de un receptor de membrana acoplado a proteína G (G-CPR), permitiendo la activación de la adenil ciclasa (AC) quien estimula la síntesis de AMPc (Figura 1.9) (Vaughan *et al.*, 2014).



**Figura 1.9** La cafeína inhibe la enzima fosfodiesterasa y genera la acumulación de AMPc intracelular, manteniendo activas las vías de transducción de señales que también se activan en respuesta a la adrenalina (Modificado de Nelson y Cox, 2013).

### 1.7.1 Estudio de la cafeína en plantas

La cafeína presente en más de 60 especies de plantas, es un producto del metabolismo secundario que es mayoritario en las hojas de té (*Camellia sinensis*) y en las semillas del café (*Coffea arabica*), también está presente en las hojas de mate (*Ilex paraguariensis*) y en las semillas de cacao (*Theobroma cacao*) en concentraciones de 1 mg/g de peso seco (Ogawa *et al.*, 2001). Aunque es más abundante en los frutos y las hojas, se sintetiza y se acumula en toda la planta (Uefuji *et al.*, 2003).

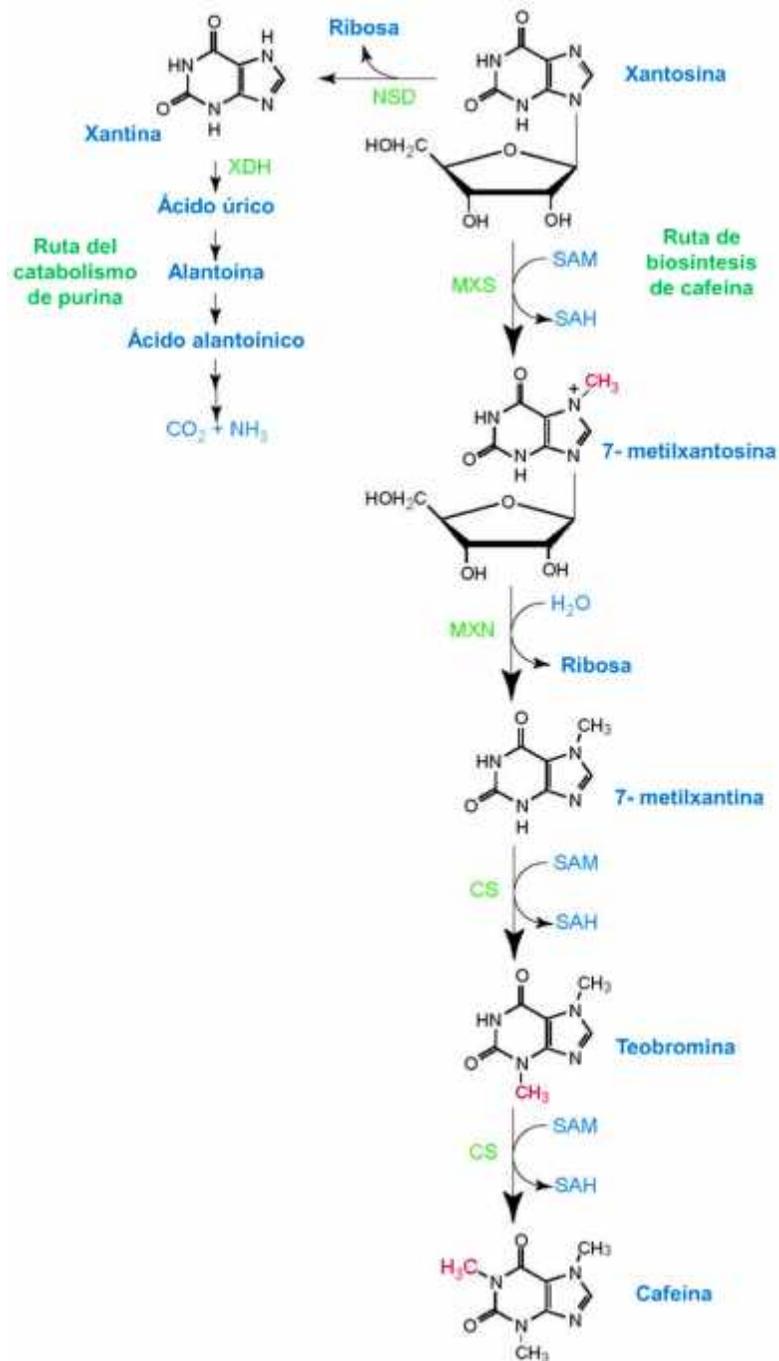
La cafeína que se biosintetiza en las plantas presenta actividad antimicrobiana y genera un efecto de alelopatía negativa en el crecimiento de otras plantas (Maniega *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la cafeína es liberada de las semillas y hojas en descomposición y se acumula en medios acuosos, sugiriendo almacenamiento en una forma soluble en el suelo. La acumulación de la cafeína en semillas, cotiledones, y/u hojas jóvenes, tiene un papel biológico como defensa química, sirviendo como un anti-herbívoro; en una concentración muy por debajo de la que se encuentra en los granos de café y hojas de té,

la cafeína extermina casi todas las larvas del gusano de tabaco (*Manduca sexta*) en un periodo de 24 horas (Buchanan *et al.*, 2014).

La autoxicidad que produce la cafeína es uno de los principales problemas en los suelos cafetaleros, según estimaciones entre 150-200 g de materia seca liberan entre 1–2 g de cafeína/m<sup>2</sup>/año en adición a otros componentes, originando limitaciones del suelo para la producción. Se ha demostrado que la cafeína aplicada externamente en plantas es absorbida por el sistema radical y traslocada principalmente a los tallos de *C. arabica* L. (Pacheco y Pohlen, 2005).

El estudio de las enzimas que participan en la ruta de biosíntesis de la cafeína y los genes que codifican las mismas, ha permitido elucidar el metabolismo de este compuesto y el control de su contenido en el té y el cafeto (Ashihara *et al.*, 2011; Kato y Mizuno, 2004). A diferencia de otros alcaloides en plantas, como la nicotina, la morfina y la estricnina, los alcaloides de purina están distribuidos extensamente a través del reino plantae aunque su acumulación en altas concentraciones es restringida a un limitado número de especies, incluyendo *C. arabica*, *Camellia sinensis* (té) y *Theobroma cacao* (cacao). Todas las plantas que contienen cafeína, excepto *Scilla marítima*, pertenecen a las dicotiledóneas. En algunas especies, la principal metilxantina es la teobromina o ácido metilúrico, incluyendo la teacrina (1,3,7,9- ácido tetrametalúrico) así como la cafeína (Ashihara y Crozier, 1999).

El estudio del metabolismo *in situ* de la cafeína con el uso de precursores marcados radiactivamente, ha demostrado que tanto las enzimas que participan en su biosíntesis y los genes que codifican las mismas, convergen en una ruta biosintética principal para este compuesto, siendo una secuencia de cuatro pasos de tres metilaciones y una reacción catalizada por la metilnucleosidasa con la actuación de xantosina como el sustrato. Aunque la información se ha obtenido principalmente del cafeto y el té, las evidencias sugieren que la ruta es esencialmente la misma en otras plantas con la formación de metilxantinas (Denoëud *et al.*, 2014; Koyama *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2002). Uno de los primeros estudios de la ruta de biosíntesis de la cafeína se llevó a cabo en los 1970s por Suzuki y Takahashi (1975) en la cual se indicó que la cafeína es aquella que se deriva de la xantosina 7- metilxantosina 7-metilxantina teobromina cafeína (Figura 1.10), esta ruta fue confirmada por Ashihara *et al.* (1996).



**Figura 1.10** Ruta de biosíntesis de la cafeína a partir de la xantina y ruta del catabolismo de la xantina a  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_4$ . CS, cafeína sintasa; MXS, metilxantosina sintasa; MXM, metilxantosina nucleosidasa; NSD, inosina-guanosina nucleosidasa; SAH, S- adenosil homocisteína; SAM, S- adenosil metionina; XDH, xantosina deshidrogenasa (Ashihara y Crozier, 2001).

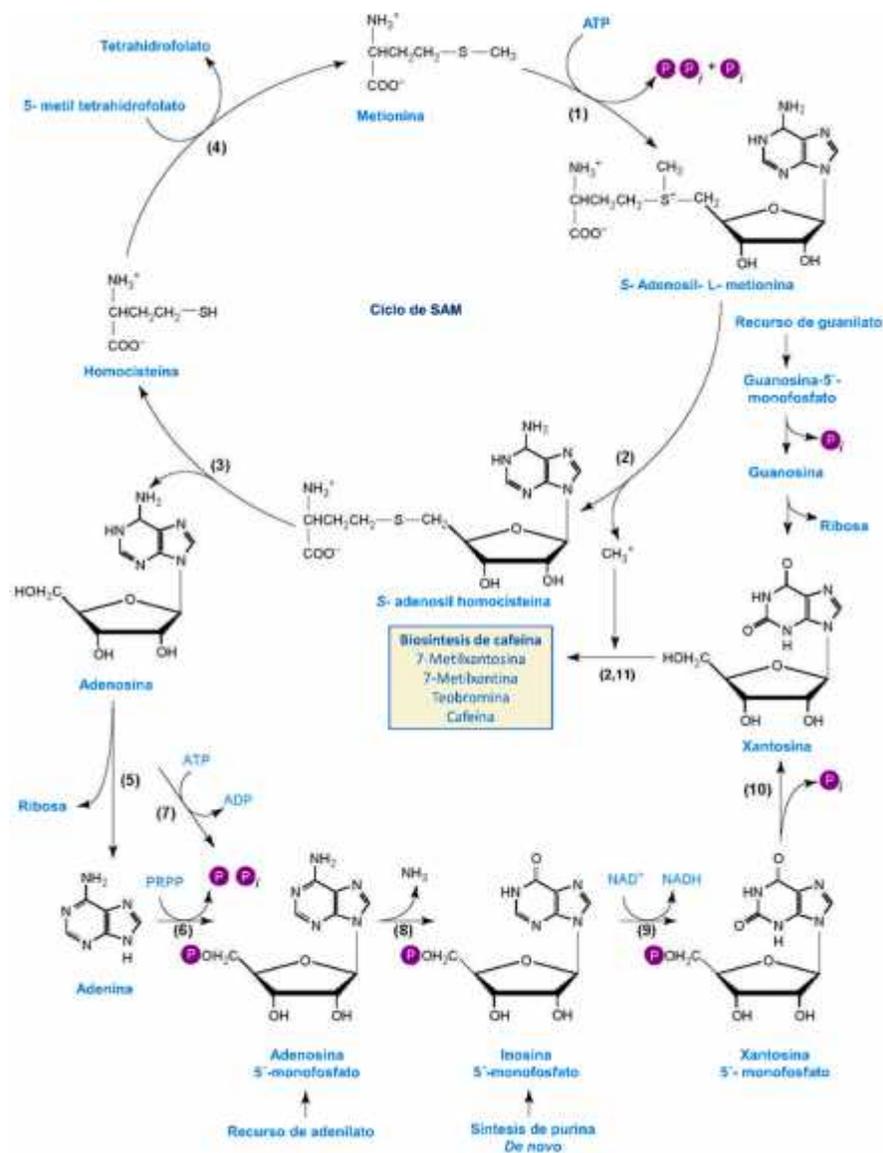
Los estudios de la biosíntesis y degradación de la cafeína en el cafeto han sido llevados a cabo, predominantemente, en frutos de *C. arabica* (Suzuki *et al.*, 1992), y aunque los pasos metabólicos son conocidos, el control de los niveles de cafeína en los tejidos del cafeto aun no son completamente comprendidos. Recientemente, se ha demostrado que algunos factores de estrés biótico como la radiación luminosa, el estrés hídrico, entre otros, tienen un papel importante en la acumulación del contenido de cafeína en las plantas de cafeto (Kumar *et al.*, 2015a, 2015b).

En estudios llevados a cabo en suspensiones celulares de *C. arabica* L. se ha demostrado que la biosíntesis de la cafeína es estimulada por la irradiación luminosa (Kurata *et al.*, 1998), también se ha observado que la degradación de la cafeína es un mecanismo utilizado para la formación de alantoína (Figura 1.10), siendo un recurso de nitrógeno en condiciones deficientes del mismo (Pompelli *et al.*, 2013).

### **1.7.2 Regulación metabólica de la cafeína sintasa**

Las enzimas *N*-metiltransferasas que catalizan la biosíntesis de la cafeína son la 7-metilxantosina sintasa, la teobromina sintasa y la cafeína sintasa. La primera y la segunda enzima catalizan las dos primeras reacciones respectivas en la biosíntesis de la cafeína y la CS tiene una doble función al catalizar las dos últimas reacciones en donde se lleva a cabo la transferencia de los grupos metilo (Koshiro *et al.*, 2006).

La actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de cafeína se han podido estudiar con el uso de la *S*-adenosil metionina (SAM) marcada con radioisótopos como el  $^{14}\text{C}$  ó el  $^3\text{H}$ . Este sustrato utilizado como donador de grupos metilo y que ha sido marcado, permite estimar la actividad de las *N*-metiltransferasas (Baumann *et al.*, 1983). Existen datos publicados que indican que la conversión de SAM a xantosina es un recurso en el cual el anillo de purina de la cafeína puede ser producida exclusivamente por esta ruta en hojas de té. La formación de cafeína por esta ruta está fuertemente asociada con el ciclo de la SAM (Figura 1.11), también conocido como el ciclo metil activado, porque los tres pasos en la ruta de biosíntesis de cafeína usan a la SAM como el donador de grupos metilo (Koshiishi *et al.*, 2001).



**Figura 1.11** Ciclo de la S- adenosil-L-metionina y ruta de biosíntesis de alcaloides derivados de purina. La xantósina utiliza a la inosina 5'- monofosfato como intermediario. La xantósina se utiliza como recurso de adenilato y guanilato. ADP, adenosina- 5'- difosfato; ATP, adenosina 5'- trifosfato; NAD<sup>+</sup>, nicotinamida adenina dinucleótido; NADH, NAD reducido; PRPP, 5'-fosforibosil-1-difosfato. Enzimas: (1) SAM sintetasa; (2) N- metiltransferasa dependiente de SAM; (3) S- adenosil-L- homocisteína hidrolasa; (4) metionina sintasa; (5) adenosina nucleosidasa; (6) adenosina fosforibosiltransferasa; (7) adenosina cinasa; (8) adenosina 5'- monofosfato deaminasa; (9) inosina 5'- monofosfato deshidrogenasa; (10) 5' nucleotidasa; (11) 7- metilxantósina nucleosidasa (Ashihara *et al.*, 2001).

Las actividades *N*-metiltransferasas involucradas en la biosíntesis de cafeína son extremadamente lábiles en extractos libres de células; sin embargo, en el trabajo de Kato *et al.*, (1999) se reportó la primera proteína purificada *N*-metiltransferasa con una alta actividad específica. La CS que se purificó en hojas de té presentó una actividad específica de 5.7 nkat/mg de proteína. La estimación de la masa molecular de la enzima nativa fue de 61kD por cromatografía de filtración en gel y 41kD por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; se demostró que tiene un pH óptimo de 8.5, y presenta una alta actividad con sustratos como paraxantina, 7-metilxantina y teobromina (Ashihara y Krosier, 2001, Kato *et al.* 1999).

La CS que participa en los dos últimos pasos de la biosíntesis de cafeína, se ha localizado en los cloroplastos de hojas de té (ver figura 1.9). Esta enzima tiene un pH óptimo alcalino similar al de las enzimas fotosintéticas activadas por irradiación luminosa, condición en la que también se ha demostrado un incremento en el pH del estroma entre 7.8 a 8.0 (Tikhonov, 2013), esto hace más factible la estimulación de la actividad de la CS y concuerda con los reportes en donde se demuestra que la radiación luminosa estimula fuertemente los pasos de metilación de la biosíntesis de cafeína en el plántulas de cafeto (Kumar *et al.*, 2015a), así como la producción de cafeína en suspensiones celulares de *C. arabica* (Kurata *et al.*, 1998). Por otra parte, la radiación luminosa no afectó la tasa de acumulación de cafeína en un modelo *in vivo* de plántulas de té, y tampoco afectó la actividad enzimática de la CS, en comparación a lo observado bajo condiciones de oscuridad, sugiriendo que en este modelo de estudio la CS y otras enzimas involucradas en la biosíntesis de cafeína, podrían estar localizadas en proplastidios (Koshiishi *et al.*, 2000).

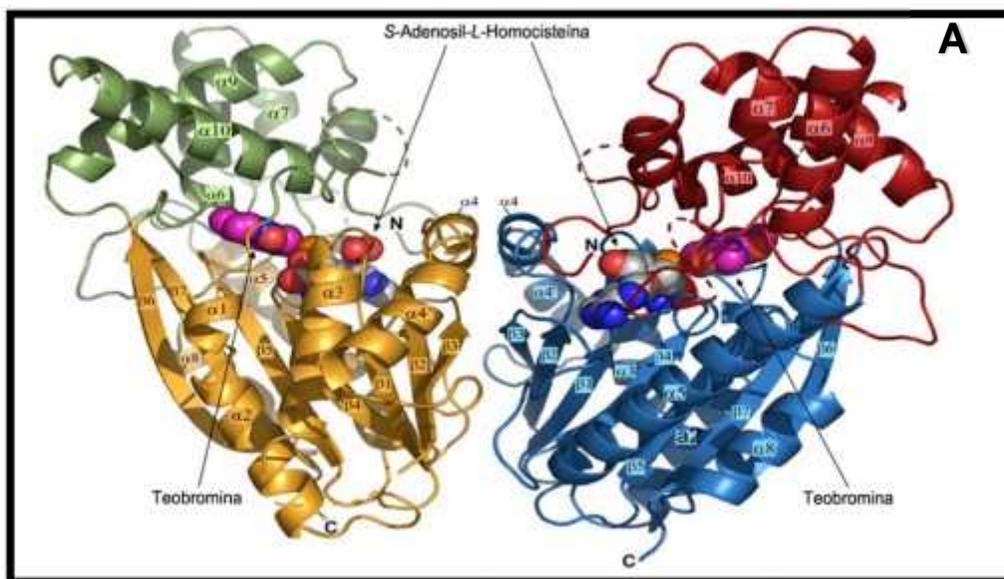
La biosíntesis y la biodegradación de la cafeína en el cafeto involucran varios pasos. La concentración de la cafeína es inevitablemente un resultado del balance entre las dos rutas. El balance entre la síntesis y la degradación es afectada por la disponibilidad de los sustratos de las enzimas involucradas en la expresión de los genes relacionados, que son probablemente modulados por factores bióticos y abióticos. Sin embargo, aún no hay mucha investigación llevada a cabo del efecto de estos posibles factores en frutos del cafeto (Mazzafera y Silvarolla, 2010).

La actividad enzimática de la CS muestra cinéticas típicas de Michaelis-Menten. Entre otras características, la enzima no presenta inhibición de retroalimentación por el producto de la cafeína. Uno de los factores que afectan la actividad de la CS *in vitro* se debe a la inhibición por el producto de S-adenosil-L-homocisteína (SAH). La CS es inhibida completamente por bajas concentraciones de SAH. Por lo tanto, el control de la tasa intracelular de SAM:SAH es un posible mecanismo de regulación de la actividad de la CS *in vivo* (Kato *et al.*, 1999).

La CS y la teobromina sintasa (TS) son enzimas que están presentes en toda la planta del cafeto. El requerimiento de ambas enzimas aun no es claro, debido a que a la CS puede catalizar las dos reacciones de transferencia del grupo metilo. La expresión de isoformas de la TS se ha determinado en varios tejidos de la planta del cafeto, mientras que la expresión de la CS es predominantemente en frutos inmaduros. Estos resultados han sugerido una posible consecuencia en los niveles de producción de cafeína en frutos inmaduros. La comparación de las secuencias de aminoácidos entre la CS y la TS ha permitido elucidar que aminoácidos son importantes para la discriminación por el sustrato de ambas enzimas (Kato y Mizuno, 2004; Uefuji *et al.*, 2003).

Los análisis bioquímicos de la estructura cristalográfica de la CS de *C. canephora* han demostrado que de los 15 residuos de aminoácidos entre 5 Å del sitio de unión a la teobromina, solo tres tienen una importancia crucial en la discriminación por el sustrato específico, comparado con los residuos 27, 237 y 266 de la TS. Estos residuos se identifican en la TS como Ala27, Pro237 y Phe266 y en la CS como Phe27, Ser237 y Ile266. La fenilalanina de la TS en la posición 266, se ha sugerido que puede causar un choque estérico con un grupo metilo en la posición N3, impidiendo la unión de la teobromina y su subsecuente metilación, esto se pudo comprobar al sustituir el residuo Ile266 de la CS por una fenilalanina, por lo tanto, esta sustitución fue importante para la discriminación por el sustrato en el café (McCarthy y McCarthy, 2007).

La estructura proteica de la TS y la CS son casi idénticas, ambas enzimas poseen dominios, un dominio metiltransferasa dependiente de SAM (residuos 23-162, 190-227, 266-295, y 367-379 para la CS) y un dominio de horquilla con  $\alpha$ -2helices (residuos 1-22, 163-189, 228-265, y 296-366 para la CS); (Figura 1.12).

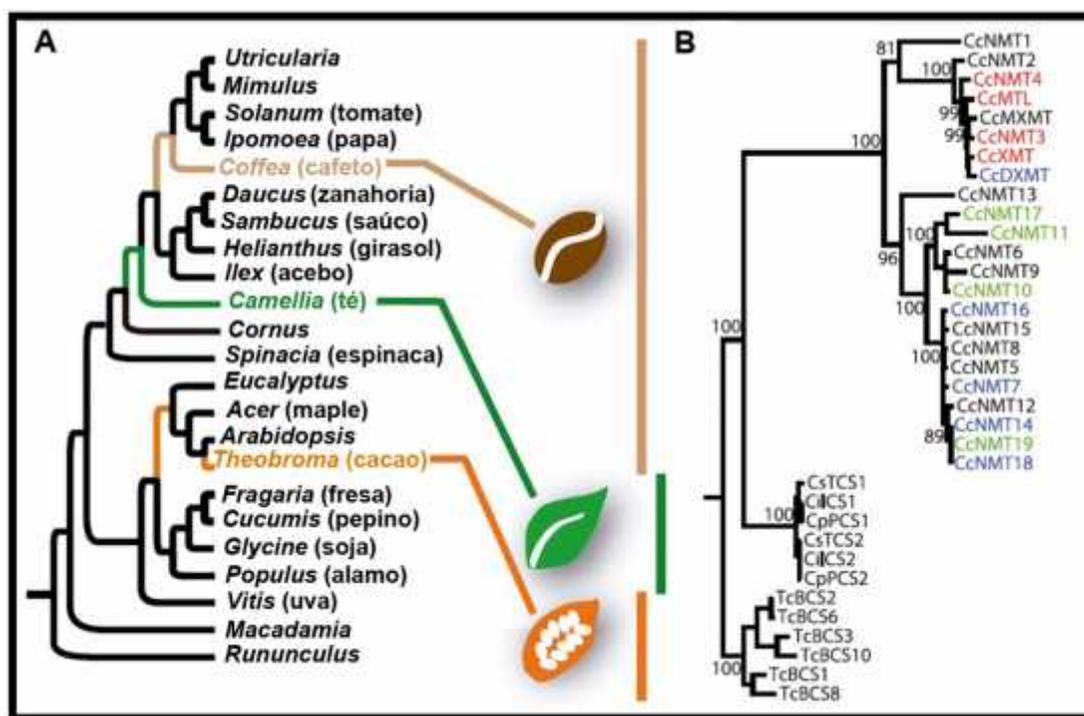


**Figura 1.12** Estructura de la CS y superposición de la TS y CS. A, Diagrama de cintas que muestra la estructura del dímero de la CS, con S-adenosil-homocisteína (SAH) en gris y teobromina (Tb) en magenta. La estructura secundaria está marcada con el dominio metil-transferasa dependiente de SAM en dorado o azul y el dominio de capucha -helice en verde o rojo (McCarthy y McCarthy, 2007).

### 1.7.3 Regulación transcripcional de la cafeína sintasa

El estudio de los genes que codifican a las enzimas involucradas en ruta de biosíntesis de la cafeína, se ha llevado a cabo con el propósito principal de entender los mecanismos moleculares que regulan la producción de este metabolito (Ashihara y Crozier, 2001; Schimpl *et al.*, 2014). Estos genes que codifican enzimas con actividad *N*-metiltransferasa, se han logrado identificar en la planta de cafeto (Perrois *et al.*, 2014) y en otras especies, como en el té y el cacao (Figura 1.13). La comparación filogenética ha demostrado que se comparten dominios altamente conservados entre sus secuencias, por lo tanto, es difícil identificar la secuencia específica de cada gen (Denoëud *et al.*, 2014).

El estudio de la correlación entre los patrones de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de la cafeína y los niveles de cafeína, ha permitido entender las diferencias de acumulación de la cafeína en las especies de *Coffea* (Perrois *et al.*, 2014).



**Figura 1.13.** Evolución de la biosíntesis de cafeína. A) Representación de la relación filogenética entre diferentes plantas dicotiledóneas que producen cafeína. B) Filogenia de genes que codifican enzimas con actividad *N*-metiltransferasas en el café, el té y el cacao (Modificado de Denoeud *et al.*, 2014).

Los genes que codifican las enzimas involucradas en la biosíntesis de la cafeína fueron amplificados exitosamente de las plantas de la familia del género *Coffea* por la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction). En estos estudios se llevó a cabo el diseño de iniciadores degenerados en base a las regiones conservadas de la CS del té (AB031280). Los productos pequeños de la PCR se utilizaron como sonda para aislar la secuencia completa de una librería de ADNc, permitiendo la identificación de los genes que codifican proteínas con actividad *N*-metiltransferasa (Ogawa *et al.*, 2001; Uefuji *et al.*, 2003; Mizuno *et al.*, 2003a)

En un estudio previo, los genes de la CS y la TS presentes en el genoma de *C. canephora*, se compararon con los del genoma de *C. arabica*. En *C. canephora* se identificó a un gen de la teobromina sintasa (*CcXMT1*), el homólogo de este gen (*CaMXMT1*) fue identificado en *C. arabica* y codificó a la misma proteína, esta también fue caracterizada bioquímicamente por Ogawa *et al.* (2001) y la denominó como 7mX. En *C.*

*arabica* también se identificó a un gen *CaMXMT2*, mismo que fue reportado por Mizuno *et al.* (2003b) como CTS2 y que no es homólogo al identificado en *C. canephora*. La presencia de dos genes que codifican a la TS en el genoma de *C. arabica*, se debería a que esta especie es alotetraploide ( $2n=4x=44$  cromosomas), y es el resultado de la hibridación de *C. canephora* y *C. eugenioides* (Perrois *et al.*, 2014).

El gen de la CS presente en el genoma de *C. canephora* (*CcDXMT*), se ha demostrado que también es homólogo al identificado en *C. arabica* (*CaDXMT2*), estos genes correspondieron al gen clonado del ADNc de hojas y del endospermo del café por Mizuno *et al.* (2003a), el cual denominó como cafeína sintasa1 de café (*CCS1*). Por otra parte, un segundo gen identificado de la CS en el genoma de *C. arabica* (*CaDXMT1*) fue similar al reportado por Uefuji *et al.* (2003), el cual denominó como *CtCS7*. Los estudios indicaron que las proteínas *CaDXMT1* y *CaDXMT2* presentes en *C. arabica*, son codificadas en el genoma de *C. eugenioides* y en el de *C. canephora* respectivamente (Perrois *et al.*, 2014).

La nomenclatura de los genes involucrados en la biosíntesis de cafeína puede ser diferente para un mismo gen, debido a que cada autor a denominado a los genes identificados según su propio criterio, lo cual dependió de la especie de la planta y la proteína que codifica (Cuadro 1.5).

**Cuadro 1.5** Identificación de genes que codifican a la CS y a la TS en especies de *Coffea canephora* y *Coffea arabica* (Modificado de Perrois *et al.*, 2014).

Especie	Enzima	Gen	Secuencia genómica	Referencias
<i>Coffea canephora</i>	7-metilxantina metiltransferasa (TS)	<i>CcMXMT1</i> 7mX	JX978517 AB048794	Perrois <i>et al.</i> , 2015 Ogawa <i>et al.</i> , 2001
	3,7-metilxantina metiltransferasa (CS)	<i>CcDXMT</i> <i>CCS1</i>	JX978516 AB086414	Perrois <i>et al.</i> , 2015 Mizuno <i>et al.</i> , 2003a
<i>Coffea arabica</i>	7-metilxantina metiltransferasa (TS)	<i>CaMXMT1</i> 7mX	JX978519 AB048794	Perrois <i>et al.</i> , 2015 Ogawa <i>et al.</i> , 2001
		<i>CaMXMT2</i> CTS2	JX978520 AB054841	Perrois <i>et al.</i> , 2015 Mizuno <i>et al.</i> , 2003b
	3,7-metilxantina metiltransferasa (CS)	<i>CaDXMT1</i> <i>CtCS7</i>	KF678863 AB084125	Perrois <i>et al.</i> , 2015 Uefuji <i>et al.</i> , 2003
		<i>CaDXMT2</i> <i>CCS1</i>	KJ577793 AB086414	Perrois <i>et al.</i> , 2015 Mizuno <i>et al.</i> , 2003a

El gen denominado *CtCS7*, codifica a una enzima de CS putativa, se ha demostrado que la proteína heteróloga tiene una baja actividad con el sustrato de paraxantina pero no con la teobromina. Por otra parte, las enzimas denominadas como *CaDXMT1* y *CCS1* tienen la característica de presentar afinidad con el sustrato de la teobromina a concentraciones de 1200  $\mu\text{M}$  y 157  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Uefuji *et al.*, 2003).

La expresión de *CaDXMT1* se lleva a cabo exclusivamente en frutos inmaduros, mientras que la *CCS1* es expresada en todos los tejidos que contienen cafeína. Una diferencia entre estas dos enzimas es el hecho de que la *CaDXMT1* tiene menor actividad con el sustrato 7-metilxantina y teobromina (1 y 4%, respectivamente, considerando el 100% de la actividad por paraxantina) mientras que la *CCS1* tiene mayor actividad (16-24% por 7-metilxantina y 23-25% por teobromina). La *CCS1* se ha sugerido ser una enzima con doble funcionalidad, similar a la *TCS1* de té (Kato y Mizuno, 2004).

Los patrones de la síntesis de cafeína durante el desarrollo del fruto en *C. arabica* y *C. canephora* son similares. La ruta de biosíntesis de la cafeína es activa desde la expansión del pericarpio a la formación del endospermo y en semillas a través de la maduración (Koshiro *et al.*, 2006). Los transcritos de la *CCS1* están presente en los frutos con varios estados de crecimiento, a excepción de los tejidos completamente maduros. Los patrones de estos genes durante el crecimiento están relacionados a la síntesis *in situ* de la cafeína de los nucleótidos de adenina (Mizuno *et al.*, 2003a).

En el desarrollo de los frutos de *C. arabica*, los niveles de transcritos de la *CCS1* son más elevados en semillas que en el pericarpio. La actividad de la CS nativa (3N-metiltransferasa) está distribuida en ambos órganos de una manera similar. Por lo tanto la acumulación de cafeína en semillas maduras parece ser sintetizada dentro de las semillas en desarrollo (Koshiro *et al.*, 2006).

El estudio de los niveles de transcritos del gen de la CS en *C. canephora* (*CcDXMT*) y *C. arabica* (*CCS1*), ha demostrado las diferencias entre los perfiles de expresión del gen en las hojas de cada especie. La *CcDXMT* tiene un elevado nivel de transcritos en las hojas de *C. canephora* y esto se relaciona con los elevados niveles de cafeína producidos en el tejido; mientras que en *C. arabica* hay una menor expresión de *CCS1*, lo cual explicaría la poca acumulación de la cafeína en la hoja (Perrois *et al.*, 2014).

La regulación de la expresión del gen CS también se ha evaluado en diferentes tejidos de la planta de té. El estudio del transcriptoma en este modelo demostró la presencia de dos genes que codifican a la TCS1 y TCS2, el primer gen respectivo solo fue expresado específicamente en las hojas maduras, mientras que el segundo se expresó en todos los tejidos que fueron evaluados; sin embargo, el gen *TCS2* presentó los niveles más elevados de expresión, en los brotes, hojas jóvenes y tallos de la planta. Estos resultados son consistentes con otros estudios, en donde se ha observado que las hojas jóvenes acumularon más cafeína en comparación a las hojas maduras (Li *et al.*, 2015; Fujimori *et al.*, 1991)

Recientemente se ha estudiado el perfil de los transcritos del gen que codifica a la cafeína sintasa, en respuesta al estrés generado por la fitohormona ácido salicílico (AS) en el endospermo de frutos de *C. canephora*. En este estudio se demostró que el tratamiento con 50  $\mu$ M de AS disminuyó el nivel de los transcritos del gen que codifica para la cafeína sintasa, mientras que el tratamiento con 500  $\mu$ M de AS lo incrementó durante el estado de maduración del endospermo, en esta última concentración no se observaron cambios en el contenido de la cafeína cuando fue analizado el endospermo mientras que con 50  $\mu$ M de AS la acumulación de cafeína incrementó en un 14.8%. Los resultados de este estudio indicaron una posible regulación post-transcripcional que pudieran mantener los niveles de cafeína cuando el endospermo es sometido a una alta concentración del AS (Kumar y Giridhar, 2015).

Ante el poco conocimiento que se tiene sobre el efecto que genera el aluminio en la biosíntesis de metabolitos secundarios. Este trabajo pretende contribuir al entendimiento de como este metal puede regular la biosíntesis de cafeína en un modelo *in vitro* de suspensiones celulares de *C. arabica* L. Los datos generados permitirán sugerir si el estrés por aluminio regula la acumulación de cafeína a nivel transcripcional o post-transcripcional.

## **HIPÓTESIS**

El gen que codifica a la cafeína sintasa se sobreexpresará en suspensiones celulares de *C. arabica* L. en respuesta al estrés por aluminio, así aumentará la actividad de la actividad enzimática y la concentración de cafeína producida.

## **JUSTIFICACIÓN**

En nuestro grupo de trabajo se estableció una línea de suspensiones celulares de *C. arabica* L. sensible a la toxicidad por aluminio. En este modelo se ha demostrado que el aluminio genera un incremento en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) como respuesta al estrés oxidativo y se ha observado que también inhibe el crecimiento celular. Sin embargo, aún se desconocen los cambios que puede generar este metal en las rutas del metabolismo secundario. En el presente proyecto y de manera particular en el estudio de la biosíntesis de la cafeína (alcaloide), se analizaron cuáles son los cambios que son generados en la actividad enzimática de la CS y en los niveles de transcritos del gen que la codifica, frente al estrés del aluminio en las suspensiones celulares de *C. arabica* L.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la ruta de biosíntesis de la cafeína, en la actividad enzimática de la CS y su gen de expresión, utilizando como estrés el aluminio, en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto que produce el  $AlCl_3$  en los niveles endógenos y exógenos de la cafeína en suspensiones celulares de *C. arabica* L.
2. Determinar la actividad enzimática *in vitro* de la cafeína sintasa en suspensiones celulares de *C. arabica* L. sometidas a estrés por el  $AlCl_3$
3. Analizar los transcritos del gen *CCS1* en suspensiones celulares de *C. arabica* sometida a estrés por el  $AlCl_3$

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental que se muestra en la Figura 1.14 fue planteada con el propósito de esquematizar los puntos más importantes a cumplir en este estudio.

A continuación, se describen los resultados obtenidos, los cuales fueron organizados de acuerdo a los datos generados por cada objetivo específico planteado. En el capítulo II se describen los resultados obtenidos en los niveles de acumulación de cafeína en células. Posteriormente, en el capítulo III se presentan datos obtenidos después de evaluar la actividad enzimática *in vitro* de la cafeína sintasa. Finalmente, en el capítulo IV se muestran los datos de la medición en los niveles de expresión del gen que codifica a la cafeína sintasa.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

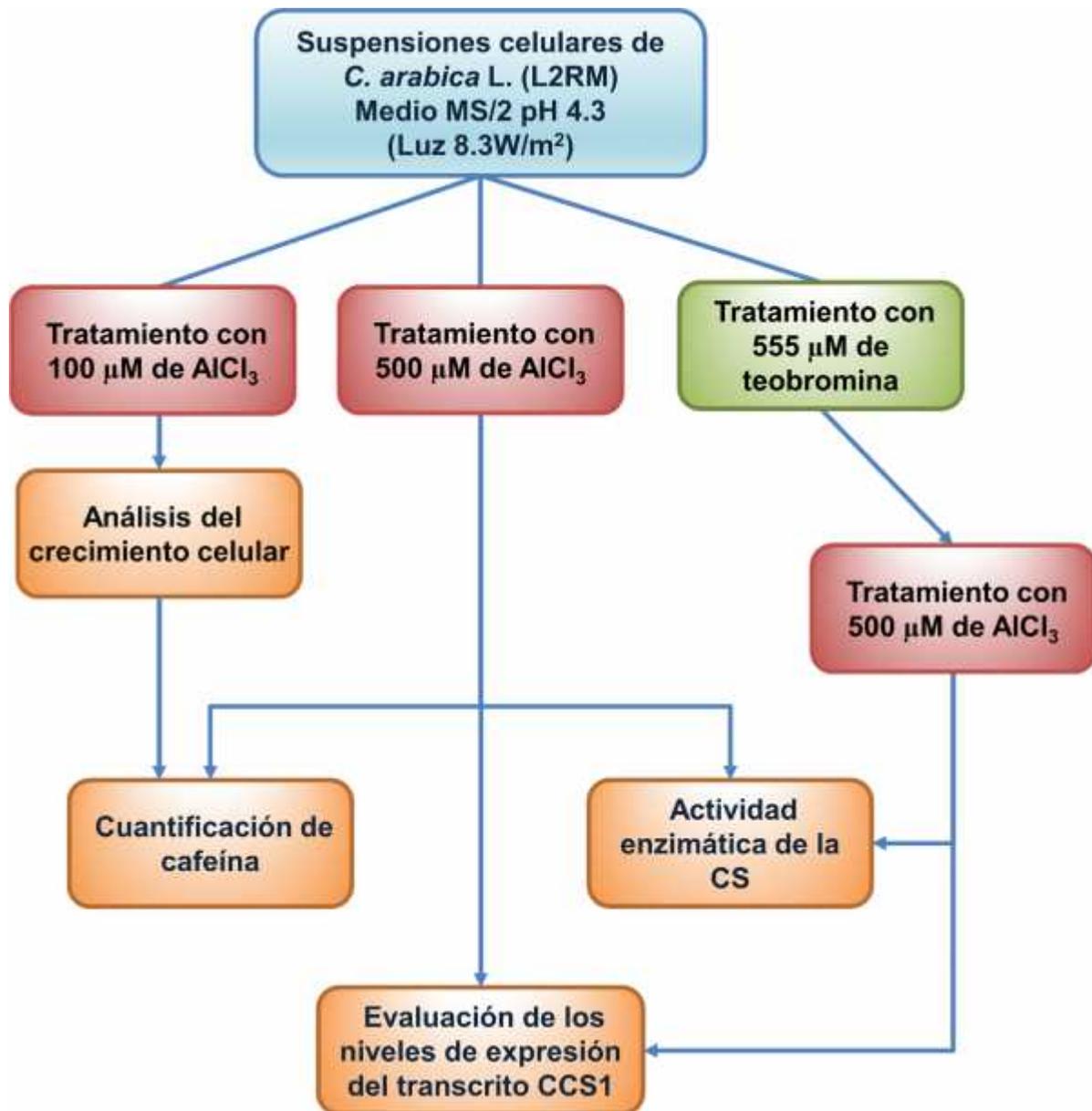


Figura 1.14 Estrategia experimental

## CAPÍTULO II

### EL ALUMINIO INDUCE LA BIOSÍNTESIS DE CAFEÍNA EN SUSPENSIONES CELULARES DE *Coffea arabica* L.

#### 2.1. INTRODUCCIÓN

La cafeína (1,3,7 trimetilxantina) es uno de los alcaloides de plantas más conocidos, se produce en las semillas, hojas y frutos de diversas plantas superiores, incluyendo tres cultivos de mucha importancia: cafeto (*C. arabica* y *C. canephora*), cacao (*Theobroma cacao*), y Té (*C. sinensis*). Es un metabolito secundario utilizado como repelente nativo de insectos y como un inhibidor para la germinación de otras semillas (Yue y Guo, 2014). Aunque la cafeína fue aislada primero del té y del café en los años de 1820, las rutas de biosíntesis y catabolismo de la cafeína no fueron completamente establecidos hasta el año 2000 (Kato *et al.*, 2000). Se han realizado estudios en modelos *in vitro* de plantas de *C. arabica* y *C. canephora* para llevar a cabo el estudio de las enzimas que participan en la biosíntesis de la cafeína y para entender de qué manera se puede estimular o inhibir la síntesis de este metabolito (McCarthy y McCarthy, 2007; Schulthess y Baumann, 1995).

Existen estudios que reportaron el uso de suspensiones celulares de *C. arabica* para analizar la producción de la cafeína, estas fueron mantenidas en condiciones de luz y con la adición de la teobromina (Sartor y Mazzafera, 2000; Kurata *et al.*, 1998). Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se utilizó a la teobromina en el medio de cultivo como precursor de la biosíntesis de la cafeína y se utilizaron condiciones de radiación luminosa en los cultivos de suspensiones celulares de *C. arabica* L.

Por otra parte, el aluminio es un factor de estrés abiótico y en el cultivo de suspensiones celulares de *C. arabica* L. se ha demostrado que este metal puede disminuir el crecimiento del cultivo en condiciones de oscuridad (Martínez-Estévez *et al.*, 2001). Este hecho nos lleva a investigar si la vía de biosíntesis de la cafeína es afectada en respuesta al estrés producido por el aluminio en el cultivo de células. Por ello, el objetivo de este capítulo fue establecer un protocolo, con las condiciones adecuadas para evaluar el efecto que produce el aluminio en los niveles de cafeína en el cultivo de células de *C. arabica* L.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1. Condiciones de cultivo de las suspensiones celulares de *C. arabica* L.**

Las suspensiones celulares de *C. arabica* L. cv Catuai de la línea L2 se obtuvieron por disgregación de callos y se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado a la mitad de la fuerza iónica (MS1/2) (Martínez-Estévez *et al.*, 2001), adicionado con sacarosa (30 g/l), 3 mg/l de ácido diclorofenoxiacético (2-4 D), 1 mg/l de 6- bencil amino purina (6-BAP), 100 mg/l de mio-inositol, 25 mg/l de cisteína, 10 mg/l de tiamina y en ausencia o presencia de 100 mg/l de teobromina. El pH del medio fue ajustado a 4.3 antes de su esterilización. Las suspensiones celulares fueron subcultivadas cada 14 días en oscuridad a 25 °C y en agitación a 100 rpm.

Se generó una nueva línea de cultivo celular denominada como L2RM, esta se obtuvo al transferir la línea celular L2 en condiciones de luz continua (8.3 W/m<sup>2</sup>) a 25°C y en agitación a 100 rpm, bajo estas condiciones de mantenimiento se continuaron las resiembras del cultivo cada 14 días y se cultivaron en el medio de la línea celular L2.

### **2.2.2. Tratamiento con AlCl<sub>3</sub>**

Las células de 14 días de ciclo de cultivo de la línea L2 o L2RM fueron tratadas con 100 µM o 500 µM de AlCl<sub>3</sub>, además se generó un tratamiento testigo que fue adicionado con un volumen proporcional de agua destilada a la concentración de AlCl<sub>3</sub>; después del tratamiento, las células fueron cosechadas y filtradas bajo vacío para separar las células del medio de cultivo. El material celular se liofilizó durante 72 horas y luego se utilizó para la extracción de la cafeína. Por otra parte, se recuperó el medio de cultivo en un tubo falcón de 50 ml y se almacenó en refrigeración hasta su análisis.

### **2.2.3 Determinación del peso fresco y peso seco**

Para medir el crecimiento celular de las suspensiones celulares se midió el peso fresco y el peso seco. Para determinar el peso fresco, las células se filtraron del medio líquido (filtro con poro de 0.45 µm), y posteriormente se pesó el material fresco. El peso seco se determinó después de liofilizar las células durante 72 h.

### **2.2.4 Extracción de la cafeína**

Para el análisis del contenido de la cafeína endógeno se tomaron 100 mg del material celular liofilizado y se maceraron hasta la obtención de un polvo fino. La extracción se llevó a cabo con 10 ml de acetona, la mezcla se agitó durante 5 h a temperatura ambiente (26°C) y luego se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm en una centrífuga clínica (SOLBAT). Se colectaron 9 ml del sobrenadante en un tubo falcón de 15 ml y se evaporó hasta sequedad a temperatura ambiente durante toda la noche, finalmente el extracto obtenido se resuspendió en 25  $\mu$ l de alcohol etílico absoluto para luego ser analizado por cromatografía de capa fina de alta resolución (HP-TLC).

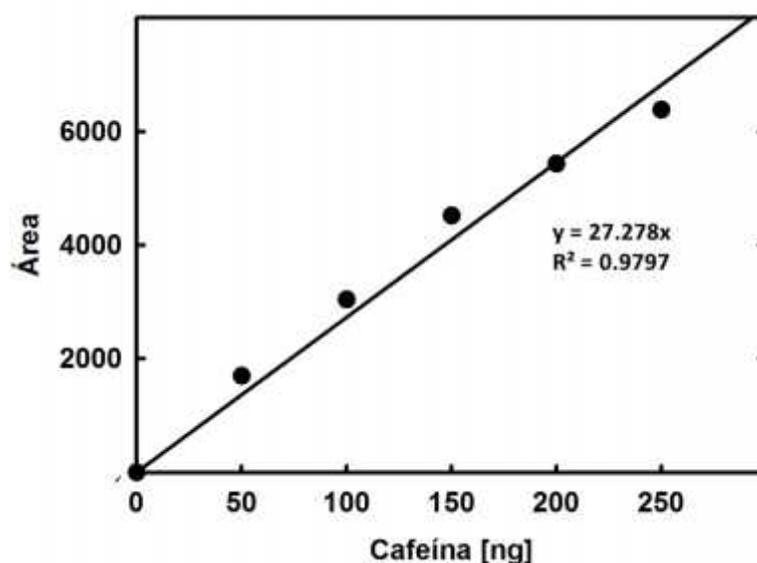
El medio de cultivo que se almacenó en refrigeración en la sección 2.2.2 se utilizó para el análisis del contenido exógeno de la cafeína. Se tomaron 30 ml del medio de cultivo y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos en una centrífuga clínica (SOLBAT), el sobrenadante se liofilizó durante una semana y luego se resuspendió con 5 ml de acetona, la mezcla se homogenizó con el politrón durante 1 min a la máxima velocidad y nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones. Posteriormente, se tomaron 1.5 ml del sobrenadante y se evaporó hasta sequedad en un tubo eppendorf limpio a temperatura ambiente durante toda la noche, finalmente el extracto obtenido se resuspendió en 50  $\mu$ l de etanol etílico absoluto y se analizó por cromatografía de capa fina de alta resolución (HP-TLC).

### **2.2.5 Determinación de la cafeína a través de HP-TLC**

Los extractos de cafeína que fueron generados en la sección 2.2.4 se aplicaron en una placa de sílica gel, previamente desarrollada con una mezcla de disolventes compuesta por  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1 v/v) antes de aplicar las muestras. La cafeína fue separada con una fase móvil compuesta por ciclohexano:acetona (40:50 v/v), donde la cafeína se identificó a partir de un estándar comercial (SIGMA). Las placas fueron visualizadas y cuantificadas por densitometría *in situ* a una longitud de onda de 273 nm, utilizando un densitómetro Linomat 5, equipado con un colector de datos WINCAT.

### 2.2.6 Curva de calibración del estándar de cafeína por HP-TLC

Para generar la curva estándar de cafeína fue necesario preparar diferentes concentraciones de cafeína (50-250 ng/ $\mu$ l), preparados a partir de una solución madre de concentración de 1 mg/ml. Cada muestra obtenida se cuantificó por triplicado y las concentraciones finales se obtuvieron a partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración promedio para la cafeína (Figura 2.1). La ecuación de la curva se utilizó para cuantificar el contenido de cafeína en las muestras de los extractos generados de células y del medio de cultivo. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que se obtuvo indicó una correlación lineal confiable para la cuantificación de cafeína.



**Figura 2.1** Curva de calibración con el estándar de cafeína por HP-TLC. Se utilizaron concentraciones crecientes del estándar de cafeína (50-250 ng/ $\mu$ l). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 273 nm en un densitómetro Linomat 5. En la curva se indicó la ecuación de la recta de calibrado ( $y$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El resultado es el promedio de tres replicas experimentales.

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Identificación de la cafeína en extractos de suspensiones celulares de *C. arabica* L.

Para determinar las condiciones adecuadas para llevar a cabo el estudio de la biosíntesis de cafeína en el modelo de estudio, se realizó un experimento en donde se evaluó el contenido de cafeína en células mantenidas en condiciones de oscuridad o irradiación luminosa. Por otro lado, a los cultivos se les adicionó teobromina como precursor de la biosíntesis de cafeína debido a que en reportes previos se ha estudiado la biosíntesis de cafeína bajo esta condición (Sartor y Mazzafera, 2000; Kurata *et al.*, 1998).

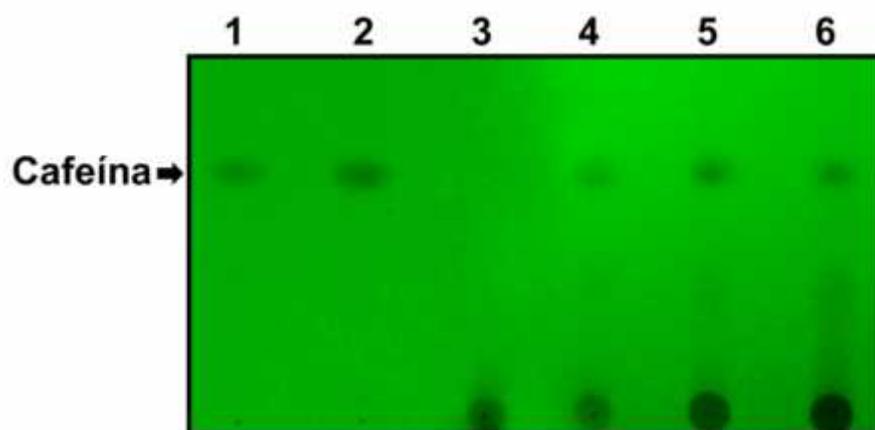
Posteriormente, para comprobar que el método de extracción de la cafeína en células fue el adecuado, se analizaron hojas maduras de cafeto como testigo positivo. En este tejido vegetal se ha reportado una concentración de hasta 2.4 mg de cafeína/g de tejido fresco de hoja (Ashihara *et al.*, 1996). Las hojas de cafeto que se analizaron en este experimento fueron tomadas de plantas cultivadas en las instalaciones del Centro de Investigación Científica de Yucatán. Se utilizaron 5 mg de tejido en peso seco y se llevó a cabo el procedimiento de extracción descrito en la sección 2.2.4. La cuantificación del contenido de cafeína en los extractos de células y hojas se llevó a cabo como se describe en la sección 2.2.5.

El resultado de la separación de la cafeína por TLC (Figura 2.2) demostró una única banda separada de cafeína en los extractos de células y de hoja, la cual migró con un  $R_f$  de 0.34, semejante al de la cafeína estándar. En el extracto de hoja (testigo positivo) se detectó la banda de cafeína esperada. Por otra parte, no se detectó ninguna banda en el extracto generado de células mantenidas en la oscuridad, indicando que bajo esta condición no se sintetizan niveles detectables de cafeína. Ante este resultado, las células de *C. arabica* L. fueron mantenidas en un medio de cultivo adicionado con la teobromina como el precursor de la ruta de la biosíntesis de cafeína y se expusieron a radiación luminosa, en estas condiciones reportadas como las adecuadas para el estudio de la biosíntesis de cafeína en plántulas y células de *Coffea*, también se logró observar la banda separada de cafeína.

En el Cuadro 2.1, se puede observar el contenido de cafeína medido por densitometría, en las muestras de los extractos generados en hojas y células. En la muestra del testigo

positivo (hoja), se observó el nivel de concentración más alto de la cafeína con 6 mg de cafeína/g de tejido seco. En el extracto generado de células mantenidas en oscuridad no fue posible cuantificar a la cafeína; sin embargo, en las células expuestas con radiación luminosa se cuantificaron hasta 90  $\mu\text{g}$  de cafeína/g de tejido. Este resultado fue consistente con los reportes que han señalado que el estrés por luz actúa como un inductor en la biosíntesis de la cafeína en los cultivos celulares (Ver sección 1.7.2). Por otro lado, las células tratadas con la teobromina en el medio de cultivo y luego mantenidas en oscuridad o luz mostraron un incremento en los niveles de cafeína, este resultado indicó que las células solo necesitan del precursor para que se produzca el producto final.

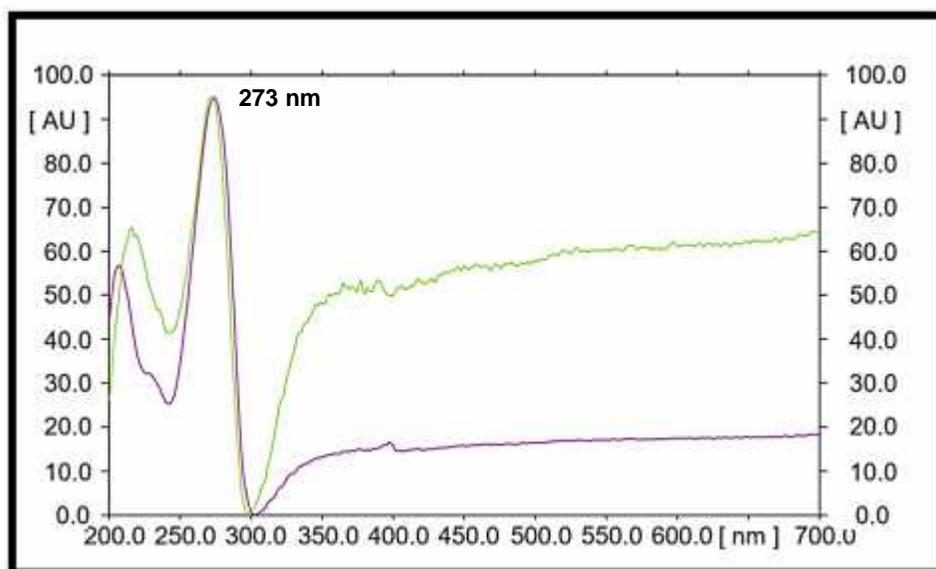
Para comprobar que el compuesto separado en la placa cromatográfica correspondía a la cafeína, se llevó a cabo el barrido mediante HP-TLC de la cafeína en la muestra estándar y la detectada en extracto generado en células mantenidas en luz. El resultado del barrido indicó un pico de absorción máxima a 273 nm en el espectro de luz ultravioleta (UV) para la cafeína. Tanto la cafeína en la muestra estándar como la detectada en el extracto de células, presentaron el mismo pico de absorción máxima y se demostró que el compuesto separado en el extracto celular corresponde a la cafeína (Figura 2.3).



**Figura 2.2** Detección de la cafeína por HP-TLC en extractos de células de *C. arabica* L. de 14 días de cultivo. 1: Estándar comercial (300 ng de cafeína); 2: Hojas de *C. arabica* L. (extracto generado de 5 mg de tejido); 3: células mantenidas en oscuridad; 4: células mantenidas en radiación luminosa ( $8.3 \text{ W/m}^2$ ); 5: células tratadas con teobromina ( $555 \mu\text{M}$ ) y mantenidas en oscuridad; 6: células tratadas con teobromina ( $555 \mu\text{M}$ ) y mantenidas en radiación luminosa ( $8.3 \text{ W/m}^2$ ).

**Cuadro 2.1** Contenido de cafeína en hojas y células de *C. arabica* L. mantenidas bajo diferentes condiciones de cultivo.

Muestra	Contenido de cafeína / g de tejido
Hoja	6 ± 1 mg
Células mantenidas en oscuridad	No detectable
Células mantenidas en luz	90 ± 9.5 µg
Células en presencia de teobromina y mantenidas en la oscuridad	942 ± 27 µg
Células en presencia de teobromina y mantenidas en luz	900 ± 26 µg



**Figura 2.3** Patrones de absorción generados por HP-TLC de la cafeína detectada en el estándar comercial de 250 ng (morado) y la cafeína en el extracto de células que fueron mantenidas en condiciones de radiación luminosa a 8.3 W/m<sup>2</sup> (verde). Las muestras fueron analizadas en el espectro de luz ultravioleta (UV).

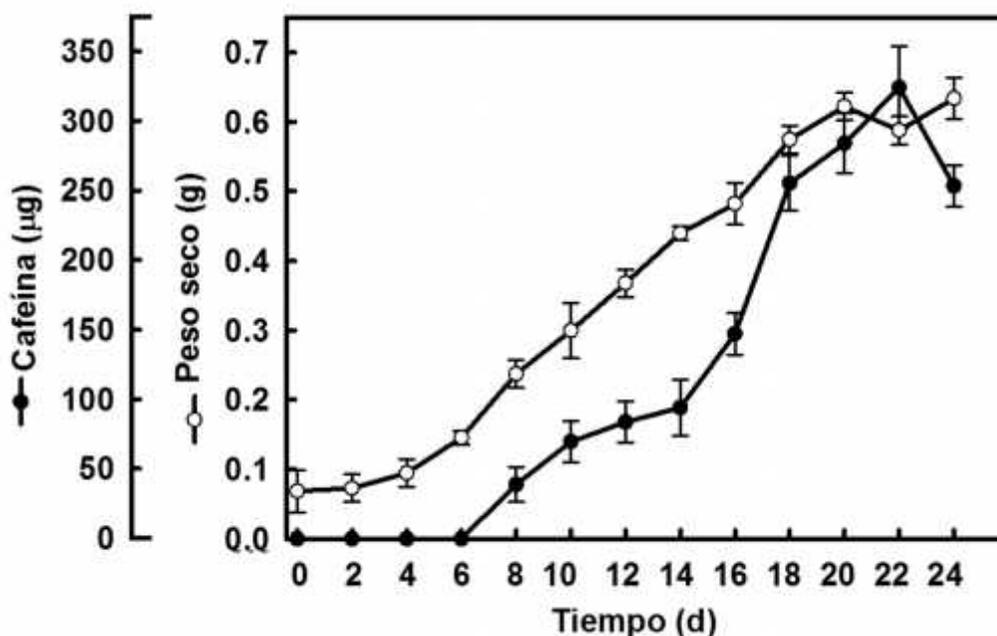
### 2.3.2. Niveles de cafeína durante el ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de *C. arabica* L.

Los resultados que se generaron en los experimentos antes descritos, indicaron que una de las condiciones óptimas para estudiar la biosíntesis de cafeína en las células fue bajo radiación luminosa; sin embargo, también fue necesario decidir en qué día del ciclo de cultivo se llevaría a cabo este estudio. Por tal motivo, se cuantificaron los niveles de

cafeína en células mantenidas en radiación luminosa durante una curva de cultivo de 24 días.

En la Figura 2.4 se muestra la curva de cultivo de las células de *C. arabica* L. cultivadas en condiciones de radiación luminosa ( $8.3\text{W/m}^2$ ). Se observó una fase de adaptación durante los primeros 4 días del ciclo de cultivo, la fase exponencial entre los días 6 a 18 y la fase estacionaria fue entre los días 20 a 24. Los resultados muestran que durante la fase de adaptación no fue posible detectar niveles de cafeína. En la fase exponencial, se observó un incremento en el nivel de cafeína hasta el día 22 del ciclo de cultivo, detectando hasta  $350\ \mu\text{g}$  de cafeína/g de tejido seco.

En base a los datos obtenidos, se decidió analizar la biosíntesis de la cafeína en el día 14 del ciclo de cultivo, esto fue por dos motivos; el primero se debió a la especulación de un día óptimo para observar la inducción o inhibición del contenido de cafeína frente a algún factor de estrés en las células, el segundo fue porque en este día se llevan a cabo las resiembras del cultivo celular.

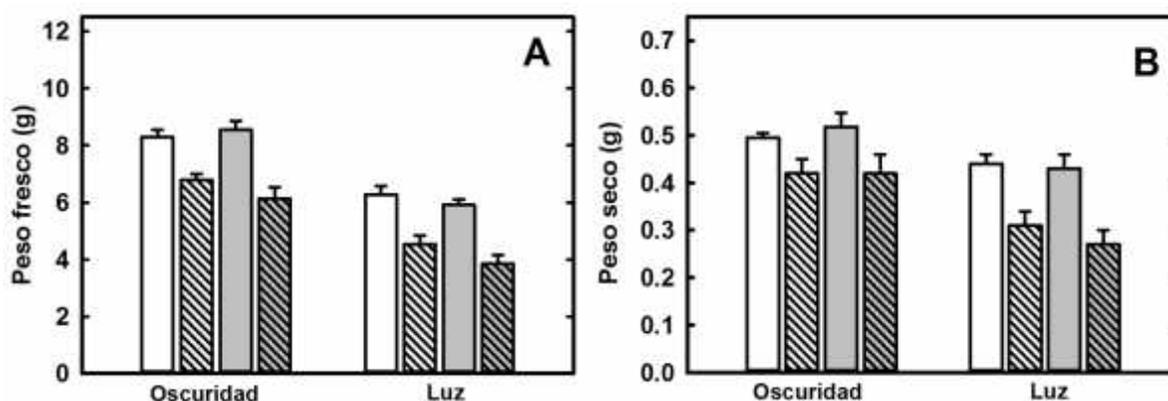


**Figura 2.4** Curva de cultivo (  $\text{---}\circ\text{---}$  ) y niveles de cafeína (  $\text{---}\bullet\text{---}$  ) en suspensiones celulares de *C. arabica* L. durante un ciclo de cultivo de 24 días en condiciones de radiación luminosa ( $8.3\text{ W/m}^2$ ). El resultado que se presenta es de dos experimentos por duplicado  $\pm$  DE.

### **2.3.3. Biosíntesis de cafeína y estrés por el $\text{AlCl}_3$ en suspensiones celulares de *C. arabica* L.**

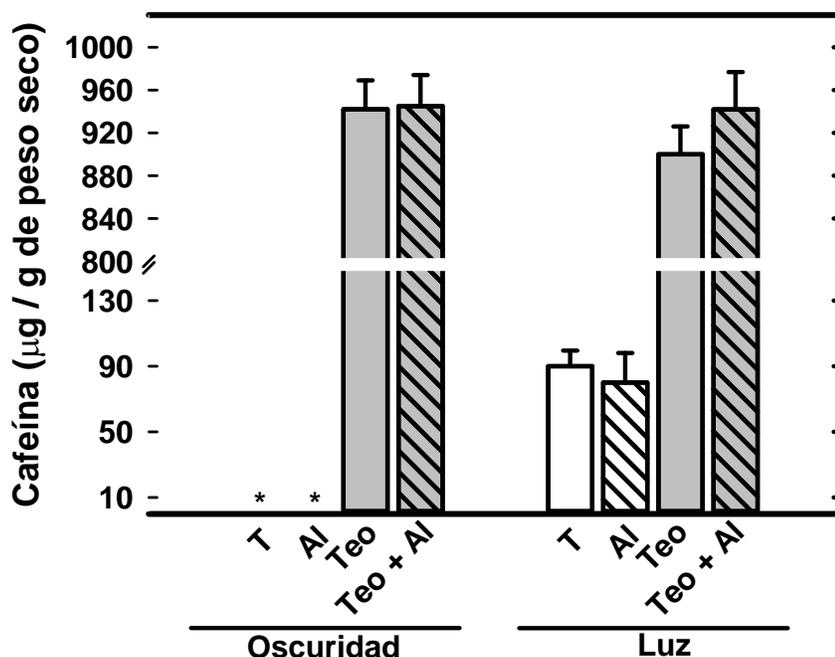
Se ha reportado que uno de los principales efectos que produce el aluminio en el cultivo de células de *C. arabica* L. es la disminución de su crecimiento durante el ciclo de cultivo. Para comprobar este efecto tóxico generado por el  $\text{AlCl}_3$  en nuestro modelo de estudio, se evaluó el tratamiento con  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  en células mantenidas en oscuridad o luz y/o adicionadas con teobromina en el medio de cultivo. La Figura 2.5 muestra el resultado del efecto que produjo este tratamiento en el crecimiento de las células con 14 días de ciclo de cultivo; las suspensiones celulares mantenidas en oscuridad se evaluaron para comparar el efecto del aluminio en condiciones iguales a lo reportado por Muñoz-Sánchez *et al.*, (2013).

El resultado que se muestra en la Figura 2.5A indicó que las células mantenidas en condiciones de oscuridad presentaron 25% más de crecimiento en comparación al crecimiento observado en las células mantenidas en radiación luminosa, también se pudo observar que la adición de teobromina en el cultivo celular no afectó el crecimiento. El tratamiento con  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  de las células disminuyó en un 10% el crecimiento de las suspensiones celulares mantenidas bajo las diferentes condiciones de cultivo. El resultado se comparó con el crecimiento reportado en peso seco (Figura 2.5B). Los resultados indicaron que el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$  presentó un efecto tóxico en el crecimiento de las suspensiones celulares de *C. arabica* L. y fue consistente a lo reportado por Muñoz-Sánchez *et al.* (2013), en donde se reportó la disminución del crecimiento celular bajo la adición de  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ; estos datos aseguraron el efecto tóxico que genera el  $\text{AlCl}_3$  en las células tratadas, tanto en ausencia como en presencia de teobromina y/o mantenidas en oscuridad o luz.



**Figura 2.5** Efecto del  $\text{AlCl}_3$  y la teobromina en el crecimiento de las suspensiones celulares de *C. arabica* L. A) Peso fresco B) Peso seco. Las células fueron tratadas con  $\text{AlCl}_3$  o teobromina y luego se mantuvieron por 14 días en oscuridad ó radiación luminosa ( $8.3 \text{ W/m}^2$ ). □: testigo; ▨:  $\text{AlCl}_3$  (100  $\mu\text{M}$ ); ■: teobromina (555  $\mu\text{M}$ ); ▩: teobromina (555  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{AlCl}_3$  (100  $\mu\text{M}$ ). Las barras representan el resultado de tres experimentos por duplicado  $\pm$  DE.

Después de comprobar el efecto tóxico que genera el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$  en las células, se determinó si en estas se generó algún cambio en los niveles de cafeína. El contenido de cafeína en células bajo condiciones de radiación luminosa y oscuridad se presenta en la Figura 2.6. El resultado indicó que las células mantenidas en oscuridad no presentaron niveles detectables de cafeína en el testigo y en el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$ ; sin embargo, las células bajo el tratamiento con teobromina y teobromina más  $\text{AlCl}_3$  se detectó un incremento de 900 veces el contenido de cafeína, debido a la presencia del precursor de la cafeína. Por otra parte, las células mantenidas en radiación luminosa presentaron 90  $\mu\text{g}$  de cafeína/g de tejido seco en el testigo y en el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$ , estos valores incrementaron 10 veces cuando las células fueron adicionadas con la teobromina. Los resultados demostraron que en las células tratadas con teobromina se logró estimular la biosíntesis de cafeína, tanto en condiciones de oscuridad como en radiación luminosa; por otra parte, el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$  durante un periodo largo (14 días) en las células, no afectó los niveles de la cafeína. Estos datos sugirieron que el  $\text{AlCl}_3$  pudiera generar cambios en la acumulación de la cafeína, durante un periodo corto de tratamiento.

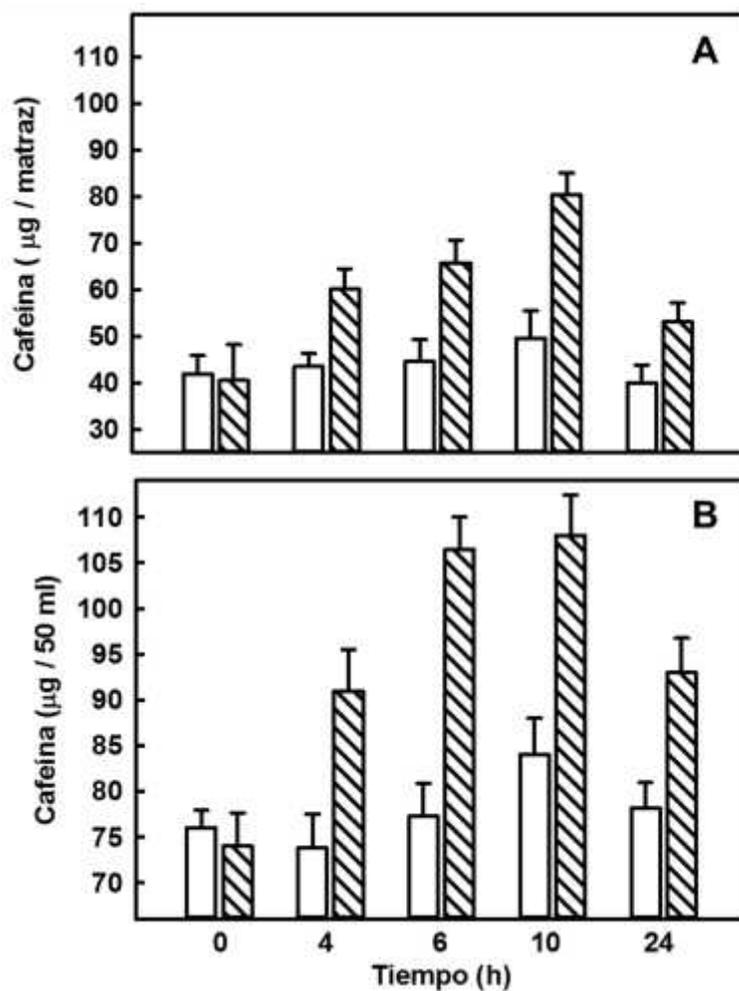


**Figura 2.6** Contenido de cafeína en suspensiones celulares *C. arabica* L.; las células fueron tratadas con AlCl<sub>3</sub> y/o teobromina y luego fueron mantenidas por 14 días en oscuridad o radiación luminosa (8.3 W/m<sup>2</sup>). □ T: testigo; ▨ Al: AlCl<sub>3</sub> (100 µM); ■ Teo: teobromina (555µM); ▩ Teo + Al: teobromina (555 µM) y AlCl<sub>3</sub> (100 µM). Las barras representan el resultado de tres experimentos por duplicado ± DE. \*, niveles de cafeína no detectados.

Los experimentos anteriores permitieron establecer que las condiciones de cultivo adecuadas para el estudio de la biosíntesis de cafeína, fueron en células adicionadas con el precursor de cafeína y mantenidas en radiación luminosa, donde se lograron detectar niveles cuantificables de cafeína. En el grupo de trabajo, se ha demostrado que el tratamiento con 500µM de AlCl<sub>3</sub> incrementó hasta 1.8 veces los niveles de cafeína en células de *C. arabica* L. mantenidas en oscuridad; sin embargo, durante el análisis de la cafeína mediante HPLC solo se lograron detectar trazas de este metabolito, por lo cual se sugirió establecer condiciones óptimas para el estudio de la biosíntesis de cafeína y utilizar otro método cuantificación (Pech-Kú, 2014).

Para evaluar el efecto del  $\text{AlCl}_3$  en los niveles exógenos y endógenos de cafeína se realizó un curso temporal (0, 4, 6, 10 y 24 h) en células de *C. arabica* de 14 días de cultivo tratadas con  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . Para determinar el contenido de cafeína, se determinó la concentración de cafeína en el tejido seco de células y en el medio de cultivo (Figura 2.7). El peso seco promedio de las células por matraz estuvo en el rango de 0.44-0.46 g.

En comparación al contenido de cafeína que presentaron las muestras de células testigo, los tratamientos con  $500 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  incrementaron los niveles endógenos de cafeína en un 38%, 47%, 62% y 32% a las 4, 6, 10 y 24 h del curso temporal respectivamente (Figura 2.7A); este incremento también se observó de manera similar en el medio de cultivo en un 23%, 37%, 28%, y 18% durante estos mismos tiempos de tratamiento (Figura 2.7B); sin embargo, al comparar la concentración de cafeína cuantificada en las células y el medio de cultivo, se observó que la mayor cantidad de la cafeína total se liberó al medio de cultivo.



**Figura 2.7** Efecto de 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  en los niveles endógenos (A) y exógenos (B) de cafeína en suspensiones celulares de *C. arabica* L. mantenidas en luz ( $8.3 \text{ W/m}^2$ ). Las células con 14 días de ciclo de cultivo fueron tratadas con  $\text{AlCl}_3$  durante un curso temporal de 0, 4, 6, 10 y 24 horas.  $\square$  : testigo;  $\text{▨}$  :  $\text{AlCl}_3$  (500  $\mu\text{M}$ ). Las barras representan el resultado de tres experimentos por duplicado  $\pm$  DE.

## 2.4 DISCUSIÓN

El uso de factores bióticos o abióticos en cultivos *in vitro* de suspensiones celulares, genera un estrés y como respuesta la acumulación de metabolitos secundarios en bajas cantidades, por lo cual el uso de estos factores favorece el estudio de aquellos mecanismos que regulan su biosíntesis. En trabajos previos, algunos factores como la irradiación luminosa pueden incrementar o disminuir la acumulación de metabolitos como la cafeína en suspensiones celulares de *C. arabica* L (Kurata *et al.*, 1998; Frishknecht y Baumann, 1985). Sin embargo, poco se sabe del efecto que producen otros tipos de estrés abiótico, como el generado por metales en el metabolismo secundario de las plantas. Por lo anterior, en este proyecto se estudió la producción de cafeína bajo el estrés que produce el aluminio en un modelo *in vitro* de suspensiones celulares de *C. arabica* L.

La cafeína es un metabolito que se conoce internacionalmente por ser el compuesto activo de diversas bebidas como el café y el té. Debido a esto, se han generado protocolos para determinar el contenido de cafeína en estos productos. Por otro lado, el estudio de la cafeína se ha llevado a cabo en laboratorios de investigación para analizar la regulación de este metabolito, por lo cual se han utilizado modelos *in vitro* de diferentes especies de plantas del genero *Coffea*.

En este estudio fue necesario establecer las condiciones para la cuantificación de la cafeína por TLC; en un primer resultado mediante este método de separación, se demostró que los extractos generados de células mantenidas en oscuridad por 14 días, no presentaron niveles detectables de cafeína (Figura 2.2); este análisis sugirió que las células en estas condiciones biosintetizan niveles bajos de cafeína y esto fue consistente a lo reportado en el grupo de laboratorio, donde se demostró la presencia de trazas de cafeína en los extractos de células que fueron analizados HPLC. Los datos sugirieron que el estudio de la biosíntesis de cafeína se puede llevar a cabo en células mantenidas en radiación luminosa y tratadas en ausencia o presencia de teobromina, así como en células mantenidas en oscuridad pero bajo el tratamiento con la teobromina; Sartor y Mazzafera, (2000) y Kurata *et al.*, (1997) también reportaron estas condiciones como adecuadas para el estudio de la biosíntesis de la cafeína en células de *C. arabica*.

El incremento en los niveles de cafeína causado por el estrés de la intensidad luminosa en las células (Figura 2.6), se puede explicar con lo reportado por Koshiishi *et al.*, (2000) y Kato *et al.*, (1999), quienes indicaron que este tipo de estrés incrementa el pH del estroma a valores de 7 a 8, condiciones cercanas al pH óptimo de la CS, la cual se localiza en el cloroplasto y cataliza el último paso en la ruta de biosíntesis de la cafeína. Esto también se ha correlacionado con el incremento en la producción de cafeína en suspensiones celulares de *C. arabica* (Kurata *et al.*, 1997). Por otro lado, el análisis de los niveles de cafeína durante la curva de cultivo en células de *C. arabica* L. demostró un pico de producción de cafeína en el día 22 del ciclo de cultivo. El resultado también indicó la formación de una curva sigmoide del crecimiento de las células y de los niveles de cafeína durante su cultivo, esto fue consistente con lo reportado por otros autores (Kurata *et al.*, 1990; Baumann y Frischknecht, 1988).

La adición de teobromina (555  $\mu\text{M}$ ) a las células no afectó su crecimiento (Figura 2.5) durante 14 días; por otra parte, en estas células adicionadas con el precursor de la cafeína se incrementaron los niveles de cafeína al mismo nivel tanto en células mantenidas en oscuridad como en radiación luminosa. Estos datos sugieren que la adición de la teobromina exógena fue utilizada por las células para llevar a cabo la reacción que involucra la conversión de este precursor a la cafeína. Este resultado coincidió con lo reportado por Frischknecht y Baumann, (1980), en donde se observó un incremento en la formación de la cafeína de hasta tres veces durante el crecimiento de las células de *C. arabica* adicionadas con teobromina.

Para comprobar el efecto tóxico del aluminio en el crecimiento de las células de *C. arabica* L., estas se expusieron con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  durante 14 días (Figura 2.5). El resultado demostró que el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$ , disminuyó el crecimiento de las células mantenidas en oscuridad y en radiación luminosa. El tratamiento con  $\text{AlCl}_3$  también disminuyó el crecimiento de las células que fueron adicionadas con la teobromina (Figura 2.6). Los datos obtenidos se relacionaron con lo reportado por Martínez-Estévez *et al.*, (2001) y Muñoz-Sánchez *et al.*, (2013), quienes observaron una disminución en el crecimiento de esta línea celular después de exponerlas a la misma concentración de  $\text{AlCl}_3$ . Después de analizar el efecto tóxico del  $\text{AlCl}_3$  en el crecimiento de las células, se demostró que durante estos 14 días de exposición con  $\text{AlCl}_3$  no se generaron cambios en los niveles de cafeína en comparación a las células testigo (Figura 2.6).

Por otra parte, en la Figura 2.5 también se observó que la radiación luminosa disminuyó 25% del crecimiento celular después de 14 días de cultivo en comparación a las células mantenidas en oscuridad, estos datos pueden ser correlacionados con lo reportado por Kurata *et al.*, (1997), en donde se sugiere que el estrés de la intensidad luminosa suprime el crecimiento de las células a largo plazo durante el ciclo de cultivo.

En un estudio previo se demostró que el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 24 horas, incrementó los niveles endógenos de la cafeína hasta 1.8 veces en las suspensiones celulares de *C. arabica* L. mantenidas en oscuridad (Pech-Kú, 2014). En este estudio y bajo las mismas condiciones de tratamiento, se analizó un curso temporal (0, 4, 6, 10 y 24 horas) de exposición con  $\text{AlCl}_3$  en células de *C. arabica* L. mantenidas en radiación luminosa, luego se analizaron los niveles de cafeína en las células y en el medio de cultivo. El resultado demostró que el incremento en los niveles endógenos y exógenos de cafeína durante este curso temporal fue dependiente del tiempo (Figura 2.7, A y B); después de 24 horas de tratamiento con el  $\text{AlCl}_3$  se observó un incremento en los niveles endógenos de cafeína de hasta 1.3 veces, resultado que fue correlacionado con lo reportado por Pech-Kú, (2014); sin embargo los datos de este estudio, indicaron que a las 10 horas del curso temporal se obtuvo el mayor efecto generado por el  $\text{AlCl}_3$ , donde se observó un incremento en los niveles endógenos de cafeína de hasta 1.6 veces.

En este capítulo se logró demostrar que el tratamiento de las células con  $\text{AlCl}_3$ , no solo resultó en tener un efecto en la estimulación de los niveles de la cafeína, sino que también generó cambios metabólicos que pudieran estar implicados con la disminución del crecimiento celular. Las células presentaron un pico de acumulación de cafeína a las 10 horas de exposición con  $\text{AlCl}_3$ , en este tiempo se podrá evaluar si también se generan cambios en la actividad de la CS, la cual cataliza la producción de la cafeína.

## CAPÍTULO III

### ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CAFEÍNA SINTASA EN RESPUESTA AL $\text{AlCl}_3$ EN SUSPENSIONES CELULARES DE *C. arabica* L.

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas con actividad de *N*-metiltransferasas de la ruta de biosíntesis de la cafeína tienen una alta homología en su secuencia de aminoácidos (Kato y Mizuno, 2004). Entre estas proteínas se encuentran una familia de las metiltransferasas específicas, involucradas en la biosíntesis de pequeños y volátiles metil ésteres que actúan como moléculas de señalización en las plantas (Zubieta *et al.*, 2003). La CS ó la *N*-metiltransferasa dependiente de *S*-adenosilmetionina es una enzima que está involucrada en los dos últimos pasos de la biosíntesis de cafeína, se ha reportado que fue purificada en las hojas de té (*Camellia sinensis*) y tiene una actividad catalítica de hasta 5.7 nkat/mg de proteína. La CS tiene actividad con sustratos específicos como la paraxantina, la 7-metilxantina, y la teobromina, y presenta baja actividad con la 3-metilxantina y la 1-metilxantina (Kato *et al.*, 1999).

Por otra parte, la regulación de las enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de cafeína ha sido reportada por varios autores. Ellos demostraron que durante la fase de crecimiento de las células de *C. arabica* L. se exhibe una alta actividad metiltransferasa (Frischknecht y Baumann, 1980). El estudio de la CS de *C. canephora* mediante un análisis cristalográfico indicó que la sustitución de un solo aminoácido en la posición 266 afecta la actividad de la enzima, esto se debe a que es un residuo de aminoácido crucial para la selección entre el sustrato de la teobromina y la 7-metilxantina (McCarthy y McMacarthy, 2007). Por otra parte, en semillas de guaraná se detectó una alta actividad de la CS durante su etapa de maduración, esto se correlacionó con el alto nivel de acumulación de la cafeína cuantificada en la misma etapa (Schimpl *et al.*, 2014).

Los datos obtenidos sugirieron que el estrés por aluminio podría relacionarse con el aumento en la actividad enzimática de la CS, lo cual causaría el incremento de la concentración de cafeína en las células de *C. arabica* L. Por lo cual se propuso como objetivo en este capítulo, determinar el efecto que genera el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  en la actividad enzimática *in vitro* de la CS. Para ello, también fue necesario establecer condiciones para la medición de la actividad enzimática.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

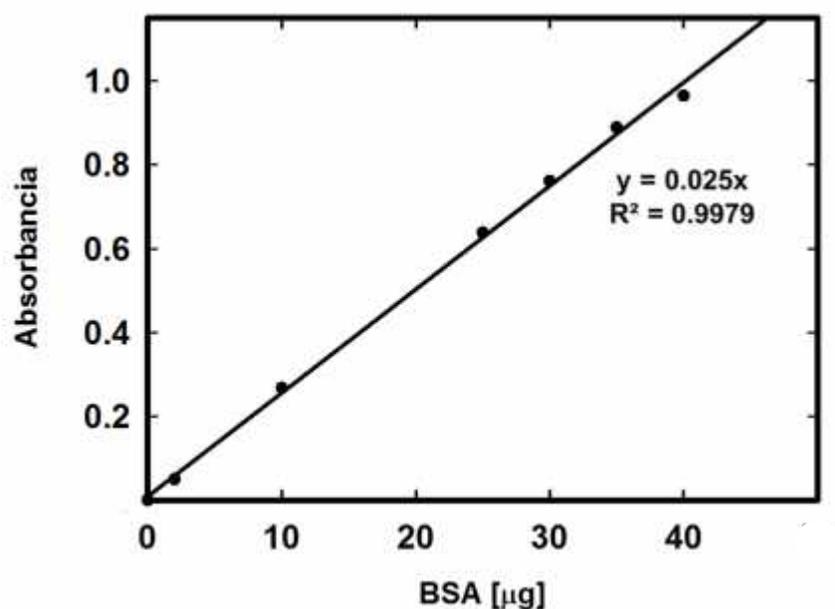
### **3.2.1. Obtención del extracto proteico**

Para la extracción del contenido de proteína total, las células de *C. arabica* fueron congeladas con N<sub>2</sub> líquido, se pulverizaron en un mortero de porcelana y se homogenizaron en una solución amortiguadora de extracción compuesta de: - mercaptoetanol 10 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 5 mM, ascorbato de sodio al 0.5%; PPVP al 2.5%; Tris-HCl 400 mM, se utilizó 1 g de células en 3 ml de solución amortiguadora (pH 8.0). La mezcla se homogenizó usando un politrón durante 2 min y se centrifugó a 20,000 x g por 20 min a 4°C. La pastilla obtenida se desechó, y el extracto se almacenó a -80°C hasta llevar a cabo su análisis.

### **3.2.2 Curva estándar de proteínas mediante el método de BSA**

Para la cuantificación de la concentración de proteínas en las suspensiones celulares de cada condición experimental, se utilizó el método comercial del ácido bicinonínico (Smith, 1985), usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. La reacción se incubó a 37°C durante 30 min y se midió las absorbancias a 562 nm. El ácido bicinonínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu<sup>2+</sup> en medio alcalino. La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, sensible y que muestra una gran tolerancia a compuestos que son afectados en otros métodos (Smith, 1985).

Para determinar el contenido de proteínas en los extractos generados de suspensiones celulares de *C. arabica* L. fue necesario generar una curva estándar de proteína. En la Figura 3.1 se muestra el resultado después de evaluar la concentración de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones.



**Figura 3.1** Curva estándar de la concentración de proteínas. Se utilizó albúmina sérica bovina como estándar. La absorbancia de las muestras se midió en el espectro de luz ultravioleta a 562 nm. En la curva se indicó la ecuación de la recta de calibrado ( $y$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). El resultado es el promedio de dos experimentos por triplicado.

### 3.2.3. Determinación de la actividad enzimática de la cafeína sintasa *in vitro*

Para la determinación de la actividad *in vitro* de la CS, se utilizó la S-adenosil-L- $(^3\text{H}$ -metil) metionina (SAM) como donador del grupo metilo a la teobromina (Mazzafera *et al.*, 1994). La mezcla de reacción (200  $\mu\text{l}$ ) contenía 4.07 kBq de [ $^3\text{H}$ -metil]SAM, 25  $\mu\text{M}$  de SAM, 7-9 mg de proteína, 200  $\mu\text{M}$  de teobromina, 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{g}$  de cafeína, el volumen final se completó con un amortiguador de Tris-HCl 100 mM, pH 8.0. La mezcla de reacción se incubó a 30°C por 30 min y se detuvo con la adición de 1 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Finalmente se centrifugó a 11000 x  $g$  durante 5 min, la fase orgánica se depositó en viales con 5 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad incorporada a la cafeína en un contador de centelleo (Mazzafera *et al.*, 1994).

### 3.3. RESULTADOS

#### 3.3.1 Medición de la actividad enzimática de la CS en extractos crudos de suspensiones celulares de *C. arabica* L.

Antes de medir la actividad enzimática de la CS *in vitro*, un paso muy importante fue la obtención del extracto proteico que mantenga a la enzima estable para llevar a cabo su actividad. La actividad de las enzimas *N*-metiltransferasas involucradas en la biosíntesis de cafeína se ha detectado en extractos libres de células preparados de frutos inmaduros (Roberts y Waller, 1979) y suspensiones celulares del cafeto (Baumann *et al.*, 1983).

La purificación de las *N*-metiltransferasas involucradas en la biosíntesis de cafeína ha sido de interés por varios investigadores. Mazzafera *et al.*, (1994) reportó la purificación de una *N*-metiltransferasa del endospermo y hojas del cafeto, su estudio demostró la presencia de la actividad de la 7-metilxantina y la teobromina *N*-metiltransferasa. Sin embargo, la actividad en las preparaciones libres de células fue extremadamente lábil, y la actividad específica de la enzima disminuyó con cada paso durante el proceso de purificación secuencial. Kato *et al.*, (1999) purificó por primera vez a la enzima CS con un alta actividad específica en hojas de té, así como también se demostró que la enzima tiene un pH óptimo de 8.5.

Con el objetivo de obtener un método adecuado para la extracción total de proteínas en las suspensiones celulares de *C. arabica* L., en este estudio se tomaron en cuenta las condiciones de extracción que se han reportado previamente. En la sección 3.2.1 se muestran las condiciones finales para la obtención del extracto crudo de proteínas, mismo que fue utilizado en la reacción *in vitro* de la CS.

Para determinar la actividad enzimática de la CS, se establecieron las condiciones de reacción que se muestran en la sección 3.2.3. Después de establecer las condiciones para analizar a la enzima, se generó un extracto total de proteínas en células de *C. arabica* L. de 14 días de ciclo de cultivo mantenidas en luz y luego se midió la actividad enzimática. El resultado se comparó con los datos obtenidos por otros autores que estudiaron esta actividad enzimática en diversos tejidos de plantas. La actividad enzimática obtenida en este estudio, fue similar a lo detectado por Mizuno *et al.*, (2003b), quienes obtuvieron a la CS purificada y luego la utilizaron en los ensayos enzimáticos *in vitro*.

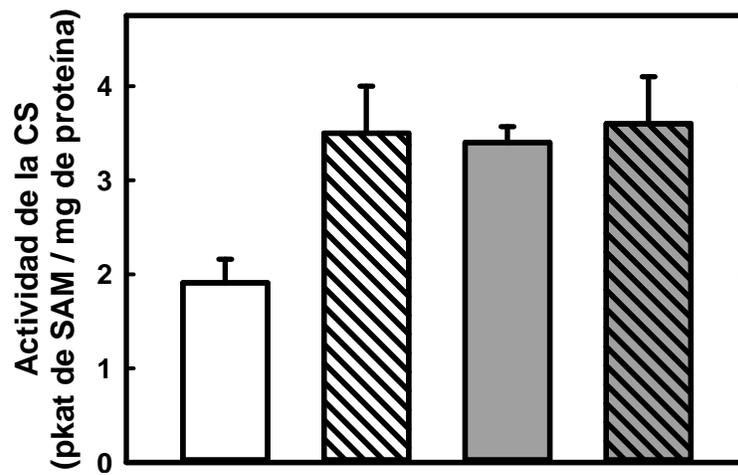
**Cuadro 3.1** Comparación de la actividad enzimática de la CS *in vitro* en diferentes tejidos de plantas. La reacción enzimática se llevó a cabo con el uso de la teobromina como sustrato.

Planta	Extracto proteico	Actividad específica de la CS/mg de proteína	Referencia
<b>Cafeto</b> Suspensiones celulares Endospermo	Extracto crudo de proteína	1.2 pkat	Este estudio Mizuno <i>et al.</i> , 2003
	Proteína purificada	5.7 pkat	
<b>Té</b> Hojas	Proteína purificada	11 pkat	Kato <i>et al.</i> , 1996
<b>Guaraná</b> Semillas	Proteína purificada	20 fkat	Schimpl <i>et al.</i> , 2014

### 3.3.2 Análisis de la actividad enzimática de la CS bajo el estrés del AlCl<sub>3</sub> en suspensiones celulares de *C. arabica* L.

Después de establecer las condiciones adecuadas para determinar la actividad de la CS en células de *C. arabica* L., se analizó el efecto que genera el estrés por AlCl<sub>3</sub> en su actividad enzimática *in vitro*. En este experimento se utilizaron suspensiones celulares de *C. arabica* L. de 14 días de ciclo de cultivo, las condiciones del cultivo de estas células fue en presencia y ausencia de teobromina en el medio de cultivo y en mantenimiento con radiación luminosa. Estas células fueron tratadas con 500 µM de AlCl<sub>3</sub> por 10 horas. Posteriormente se realizó la extracción total de proteínas y finalmente se midió la actividad enzimática de la CS *in vitro*.

El resultado de este experimento se muestra en la Figura 3.2. Las células tratadas con AlCl<sub>3</sub> incrementaron hasta 1.8 veces la actividad de la CS, comparado con la actividad de las células testigo. Este mismo incremento se observó en las células que fueron tratadas con la teobromina; sin embargo, el tratamiento con teobromina y AlCl<sub>3</sub> no modificó la actividad enzimática en comparación con el tratamiento de AlCl<sub>3</sub>. Este resultado indicó que las células de *C. arabica* L. tratadas con la teobromina presentan insensibilidad al tratamiento con AlCl<sub>3</sub>, esto podría deberse a que el precursor actúa en el mismo mecanismo de respuesta que genera el AlCl<sub>3</sub> en las células, por lo cual ambos tratamientos incrementaron la actividad enzimática de la CS al mismo nivel.



**Figura 3.2** Efecto del AlCl<sub>3</sub> en la actividad enzimática *in vitro* de la CS en células de *C. arabica* L; Las células fueron mantenidas en ausencia o presencia de 555μM de teobromina en el medio de cultivo por 14 días en luz (8.3 W/m<sup>2</sup>), después de este tiempo se llevaron a cabo los tratamientos con 500 μM de AlCl<sub>3</sub> por 10 horas. □ : testigo; ▨ : AlCl<sub>3</sub> (500 μM); ■ : teobromina (555μM); ▩ : teobromina (555 μM) y AlCl<sub>3</sub> (500 μM). La gráfica representan el resultado de dos experimentos por duplicado ± DE.

### 3.4 DISCUSIÓN

La determinación de la actividad enzimática de la CS ha sido un reto para varios investigadores (Shimpl *et al.*, 2015; Mazzafera *et al.*, 1994). En este estudio fue necesario establecer las condiciones para lograr determinar exitosamente la actividad de esta enzima. En el cuadro 3.1 se muestra el resultado de la actividad enzimática obtenida en un extracto crudo de proteínas de suspensiones celulares de *C. arabica* L., la actividad detectada (1.2 pkat/mg de proteína) fue menor a la actividad reportada por Kato *et al.*, (1996) (11 pkat/mg de proteína) y mayor a la reportada por Schimpl *et al.*, (2014) (20 fkat/mg de proteína), quienes analizaron la proteína purificada de la CS en semillas de Guaraná y *C. arabica* L. respectivamente. Estos datos fueron consistentes con lo reportado por Mazzafera *et al.*, 1994, el cual indicó que la actividad específica de la proteína purificada en semillas de *C. arabica* L. fue solo del 5% comparado con lo obtenido en el extracto crudo, concluyendo que la proteína puede ser lábil al proceso de purificación. En este estudio se logró detectar la actividad enzimática de la CS sin ningún proceso de purificación.

Después de establecer las condiciones para medir la actividad enzimática de la CS en las suspensiones celulares de *C. arabica* L., se logró demostrar que el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  incrementó 1.8 veces la actividad enzimática, en comparación a las células testigo (Figura 3.1). Este incremento podría deberse a un mecanismo de respuesta que regula el aumento de la actividad enzimática bajo el estrés generado por el  $\text{AlCl}_3$ , condición en la cual se catalizaría en mayor proporción la producción de cafeína en las células (resultados observados en el capítulo II). Este es el primer estudio llevado a cabo en un sistema *in vitro* de suspensiones celulares de *C. arabica* L., donde se demostró que el estrés por metales puede generar un efecto positivo en la vía de biosíntesis de la cafeína. Por otra lado, los datos obtenidos en este estudio pudieron ser correlacionados con el reporte de Shchimpl *et al.*, (2014), quien reportó en el tejido inmaduro de las semillas de Guaraná, el nivel de mayor actividad enzimática de la CS y también un pico de acumulación de la cafeína.

Por otra parte, se evaluó la actividad enzimática de la CS en células tratadas con la teobromina (Figura 3.1). En esta condición de cultivo con o sin el tratamiento de  $\text{AlCl}_3$ , la actividad enzimática de la CS también incremento hasta 1.8 veces, en comparación a las células testigo. Este resultado sugiere que la teobromina adicionada en los cultivos de

células, activo el mismo mecanismo de respuesta que utilizaron las células tratadas con  $\text{AlCl}_3$  y en ausencia de teobromina. Esto sugirió que la teobromina y el  $\text{AlCl}_3$  pueden activar una ruta de señalización cruzada, la cual responde al incremento en la actividad de la CS. Los resultados también indicaron que las células en presencia del precursor además de mantener una alta actividad de la CS, también catalizan en mayor proporción la producción de la cafeína, en comparación a las células sin teobromina (Figura 2.6).

Los resultados obtenidos en este capítulo lograron demostrar que el estrés por  $\text{AlCl}_3$  incremento la actividad enzimática de la CS; sin embargo, este factor de estrés también podría regular a otras enzimas que se encuentran río arriba de la ruta de biosíntesis de la cafeína, por lo cual se catalizaría la producción de los precursores involucrados en la biosíntesis de cafeína. Los resultados obtenidos en este apartado podrán ser correlacionados con cambios generados por el tratamiento de las células con  $\text{AlCl}_3$  en los niveles de expresión del gen que codifica a la CS. Finalmente, se podrá sugerir si este factor de estrés genera un posible mecanismo de regulación a nivel transcripcional o post-traducciona l en la biosíntesis de cafeína.

## CAPÍTULO IV

### NIVELES DE TRANSCRITOS DE LA CS EN RESPUESTA AL $\text{AlCl}_3$ EN SUSPENSIONES CELULARES DE *C. arabica* L.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

El estudio de la regulación transcripcional de las enzimas *N*-metiltransferasas en la ruta de biosíntesis de la cafeína en cafeto, ha permitido entender cuáles son los pasos regulatorios más importantes en la acumulación biológica de la cafeína (Kumar *et al.*, 2015a). Para detectar la expresión diferencial de un gen en distintas muestras biológicas, ya sean en diferentes tipos de tejido o bajo diferentes condiciones experimentales, el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) ha transformado el campo del análisis de la expresión de genes en los organismos vivos. En reportes previos esta herramienta se ha utilizado para analizar el nivel de expresión de la CS en la planta de *C. arabica* en sus diferentes estadios de desarrollo frente a un estrés biótico específico (Barsalobre-Cavallari *et al.*, 2009).

La cafeína es uno de los compuestos mejor estudiados en semillas de café, y la caracterización de su ruta metabólica es de gran importancia para futuras estrategias del cultivo. En *C. arabica* se ha reportado que las diferencias observadas en los perfiles de transcritos de la *CCS1* durante el desarrollo del fruto pueden deberse a mecanismos que controlan la expresión del gen, como son mutaciones en la región promotora, eventos post-transcripcionales y estabilidad del mRNA (Suzuki y Waller, 1984; Koshiro *et al.*, 2006). En un estudio reciente se demostró que el aumento en los niveles de cafeína está correlacionado con el incremento en los niveles de transcritos de las enzimas involucradas en su vía de biosíntesis en el endospermo del cafeto (Kumar y Giridhar, 2015).

En los capítulos 2 y 3, se demostró que el tratamiento de las células con  $\text{AlCl}_3$  incrementó la acumulación de la cafeína y la actividad enzimática de la CS en las células de *C. arabica* L. Para determinar si este tratamiento regula la biosíntesis de cafeína a nivel transcripcional, en este capítulo se propuso como objetivo, evaluar el efecto que genera el  $\text{AlCl}_3$  en los niveles de expresión del gen que codifica a la CS.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Extracción del ARN total por el método de Trizol

Las suspensiones celulares de *C. arabica* L. fueron filtradas al vacío, se tomaron 0.5 g de células en peso fresco y se congelaron con nitrógeno líquido, luego se extrajo el ARN total adicionando 1 ml del reactivo TRIZOL (Reagent, Invitrogen) en un mortero y se maceró vigorosamente. La mezcla se transfirió en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se le adicionó 300  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1 v/v) y 300  $\mu$ l de fenol; luego se agitó vigorosamente durante 15 seg e incubó durante 10 min a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó 20 min a 20,000 x g a una temperatura de 4°C, se colectó 300  $\mu$ l de la fase acuosa y se le adicionó 200  $\mu$ l de alcohol isopropílico para precipitar el ARN. El precipitado se incubó a 4°C durante 1 h 30 min, luego se centrifugó a 12000 x g durante 10 min a 4°C, se lavó con 1 ml de etanol (Sigma, USA) al 70% en agua/dietilpirocarbonato (DEPC) y se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua tratada con DEPC.

Para eliminar el ADN contaminante, el ARN extraído fue adicionado con 2  $\mu$ l de la enzima DNAasa (1u/ $\mu$ l) y 5  $\mu$ l del amortiguador DNAasa (10X), se incubó a 37°C x 5 horas en baño maría, esta reacción se detuvo con 5  $\mu$ l de EDTA 50 mM a 75°C. Para observar la integridad del ARN extraído, las muestras se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% adicionado con Gel-Red 3X (Bioline) a 90 V durante 1 h. El ARN separado en el gel se observó en un fotodocumentador de luz UV (Quantity One V.4.BIO-RAD). Por otra parte, la cuantificación de este ARN se llevó a cabo mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000).

### 4.2.2. Síntesis del ADN complementario (ADNc)

El ADNc se obtiene a partir de una reacción denominada como transcripción reversa. La mezcla de reacción fue la siguiente: un tubo fue adicionado con 2.5  $\mu$ l de ARN purificado (200 ng/ $\mu$ l) de cada tratamiento, 1  $\mu$ l (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l) oligo dT y 9.5  $\mu$ l de agua tratada con DEPC. Posteriormente, el tubo se incubó en el termociclador a 65°C durante 5 min y luego se mantuvo a 4°C por 2 min. Inmediatamente se le agregó 4  $\mu$ l de amortiguador de la transcriptasa reversa (RT) 5X, 2  $\mu$ l 10 mM dNTPs y 1  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa RervertAid (200 U/ $\mu$ l) (Thermo Scientific). La mezcla se sometió a un ciclo de síntesis de ADN a 43°C durante 50 min con un paso final de inactivación y desnaturalización de la enzima a 70°C por 10 min.

#### **4.2.3. Condiciones de reacción de la PCR punto final y tiempo real**

Las condiciones establecidas para llevar a cabo la PCR punto final fueron las siguientes: la mezcla de reacción contenía: 1  $\mu$ l del ADNc como molde; 1  $\mu$ l del amortiguador PCR 10X con KCl; 0.8  $\mu$ l 25 mM  $MgCl_2$ ; 0.75  $\mu$ l 10  $\mu$ M iniciador directo; 0.75  $\mu$ l 10  $\mu$ M iniciador reverso; 0.8  $\mu$ l 200 mM dNTP; 0.3  $\mu$ l 5 U/ $\mu$ l Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific) y  $H_2O$  DEPC a un volumen final de 10  $\mu$ l. El ciclo de amplificación de los iniciadores diseñados de la CS fue el siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, 40 ciclos de 95°C durante 40 min, 54°C durante 30 seg y una extensión final de 72°C durante 30 seg.

La mezcla de reacción de la RT-qPCR fue la siguiente: 1  $\mu$ g de ADNc como molde; 7.5  $\mu$ l de máxima SYBR Green qPCR master Mix (2X)/ROX, 5  $\mu$ l de  $H_2O$  grado biología molecular, 0.75  $\mu$ l 10  $\mu$ M del iniciador directo de la CS y 0.75  $\mu$ l 10  $\mu$ M del iniciador reverso de la CS hasta un volumen final de 15  $\mu$ l. El ciclo de amplificación fue el siguiente: ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, y 40 ciclos de 95°C durante 30 seg, 53°C durante 30 seg y una extensión final de 72°C durante 30 seg.

#### **4.2.4. Visualización de los productos de la PCR mediante electroforesis**

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (Ultrapure<sup>TM</sup> Agarose, Invitrogen), preparado con 1X Tris-acetato-EDTA (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) y se tiñeron con una solución 3X de Gel-Red (Biotium). El volumen de carga utilizado fue de 4  $\mu$ l, previamente mezclados con 2  $\mu$ l del amortiguador de carga (Sigma-Aldrich) y 2  $\mu$ l del producto de PCR. La electroforesis se realizó a 90 V durante 60 minutos. La visualización del gel se realizó en un transiluminador de luz UV (Ultralum, Claremont, CA, USA). Las bandas separadas se compararon con un marcador de peso molecular de 1 Kb (Bioline).

#### 4.2.5. Diseño de los iniciadores para la amplificación del gen que codifica a la CS

Para el diseño de los iniciadores, se tomó como base la secuencia del gen que codifica a la cafeína sintasa (CS o CSS1) de *C. arabica* (GenBank, AB086414.1) (Figura 4.1). Tomando en cuenta dicha secuencia, se realizó un alineamiento de secuencias de nucleótidos (BLAST) con la base de datos de SOL Genomics Networks que cuenta con el genoma de *C. canephora*. El alineamiento de nucleótidos demostró la presencia de diez genes que presentaron un alto porcentaje de identidad al de la CS (Cuadro 4.1). Estas secuencias de nucleótidos se convirtieron a secuencias de aminoácidos, y en base a estas, se generó un árbol filogenético de aminoácidos (Figura 4.2), el cual permitió seleccionar a los genes que codifican a las enzimas de mayor similitud, para diseñar los iniciadores específicos de la CS en base a las secuencias no conservadas. La ubicación de los iniciadores diseñados en la secuencia parcial del gen de la CS en *C. arabica* L. se muestra en el cuadro 4.2. Se diseñaron 5 pares de iniciadores denominados como FCCS1/RCCS1, CCSFW/CCSRV, CCSF-1/CCSR-1, CCSF-2/CCSR-1, CCSF-3/CCSR-3, los cuales amplifican fragmentos de 131, 68, 225, 211, 177 pb, respectivamente (Cuadro 4.3).

```

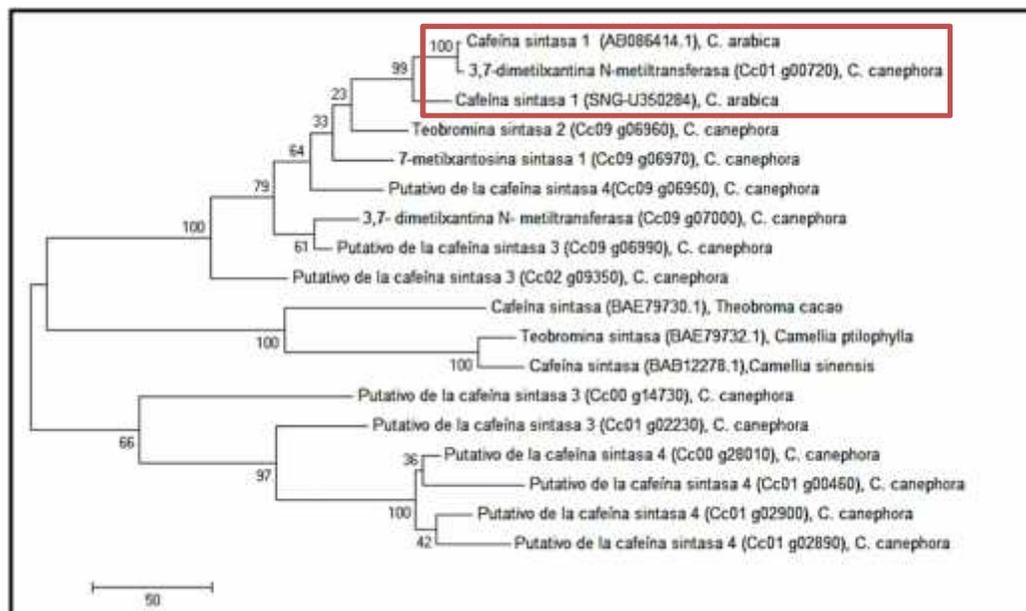
1   atggagctcc aagaagtcct gcatatgaat ggaggcgaag gcgatacaag ctacgccaaag
61  aactcatcct acaatctggt tctcatcagg gtgaaacctg tccttgaaca atgcatacaa
121 gaattgttgc gggccaactt gcccaacatc aacaagtgtt ttaaagttgg ggatttggga
181 tgcgcttctg gaccaaacac attttcaaca gttcgggaca ttgtacaaag tattgacaaa
241 gttggccagg aaaagaagaa tgaattagaa cgtcccacca ttcagatatt tctgaatgat
301 cttttccaaa atgatttcaa ttcgggtttc aagttgctgc caagcttcta cgcgaatcct
361 gagaaagaaa atggacgcaa aataggatcg tgcctgatag gcgcaatgcc cggctctttc
421 tacagcagac tcttccccga ggagtccatg ctttttttac actcctgtta ctgtttgca
481 tggttatctc aggttcccag cggtttggtg actgaattgg ggatcagtgc gaacaaaggg
541 tgcatttact cttccaaagc aagtgggtccg cccatcaaga aggcataatt ggatcaattt
601 acgaaagatt ttaccacatt tcttaggatt cattcgggag agttgatttc acgtggccga
661 atgctcctta ctttcatttg taaagaagat gaattcgacc acccgaattc catggactt
721 cttgagatgt caataaacga cttgggttatt gagggacatc tggaggaaga aaaattggat
781 agcttcaatg ttccaatcta tgcaccttca acagaagaag taaagcgcat agttgaggag
841 gaagggttctt ttgaaatatt atacctggag actttttatg ccccttatga tgctggcttc
901 tctattgatg atgattacca aggaagatcc cattccccctg tatcctgcga tgaacatgct
961 agagcagcgc atgtggcatc tgctggttaga tcaatttacg aaccatcct cgcgagtcac
1021 tttggagaag ctattttacc tgacttatcc cacaggattg cgaagaatgc agcaaagggt
1081 ctccgctcgg gcaaaggctt ctatgatagt gttatcattt ctctcgccaa aaagccggag
1141 aaggcagaca tgtaaaagtt tgtttttagt tggttttgtt gttgtggtt gtttttagat
1201 atg

```

**Figura 4.1** Secuencia del gen que codifica a la CS (GenBank, AB086414.1).

**Cuadro 4.1** Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de la CS (GenBank, AB086414.1) con la base de datos del genoma de *C. canephora* reportado en SOL Genomics.

Descripción	Accesión ó locus	% de identidad
3,7-dimetilxantina N- metiltransferasa	Cc01_g00720	99.39
Teobromina sintasa 2	Cc09_g06960	91.45
Putativo de cafeina sintasa 4 (CCS-L4)	Cc09_g06950	90.55
Monometilxantina metiltransferasa	Cc00_g24720	89.7
7-metilxantosina sintasa	Cc09_g06970	93.24
7- metilxantosina sintasa	Cc09_g06970	88.46
Putativo de la cafeina sintasa 3 (CCS-L3)	Cc02_g09350	86.4
Putativo de la cafeina sintasa 3 (CCS-L3)	Cc02_g09350	83.33
3,7-dimetilxantina N- metiltransferasa	Cc09_g07000	89.99
Putativo de la cafeina sintasa 3 (CCS-L3)	Cc09_g06990	86.73



**Figura 4.2** Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de proteínas con actividad N-metiltransferasa. El marco en color rojo indica las tres proteínas con mayor similitud al de la CS de interés. El árbol filogenético se realizó con el software MEGA versión 6.0, en el cual se compararon las secuencias de aminoácidos mediante un método de tipo máxima parsimonia con un bootstrap de 1000 réplicas.

**Cuadro 4.2** Ubicación de los iniciadores diseñados que corresponde al dominio N-metiltransferasa de la CS, se utilizó el software FastPCR versión 6.5 para verificar la factibilidad de los iniciadores.

Iniciador	Ubicación
FCCS1	673-702
RCCS1	777-803
CCSFW	404-423
CCSRV	445-471
CCSF-1	926-948
CCSR-1	1130-1150
CCSF-2	940-959
CCSF-2	1130-1150
CCSF-3	937-956
CCSR-3	1092-1113

#### 4.2.6. Diseño de los iniciadores del gen que codifica a la tubulina

Para la evaluación de los cambios en los niveles de expresión del gen *CCS1* en células tratadas con aluminio, era necesario elegir un gen que tuviera un perfil de expresión constante para la realizar la normalización de los datos. El gen de referencia utilizado en este estudio fue la tubulina y los iniciadores se diseñaron en base a la secuencia reportada por SOL Genomics Network (>Cc07\_g03260 (TUBa2) Tubulin alpha chain). Este gen se expresa constitutivamente en todas la células y es utilizado comúnmente como control en estudios de amplificación a través de PCR en tiempo real (RT-qPCR) (Zhang *et al.*, 2000). Los oligonucleótidos diseñados fueron resuspendidos en H<sub>2</sub>O-DEPC a una concentración de 100  $\mu$ M y fueron almacenados a -20°C hasta su uso (Cuadro 4.3).

**Cuadro 4.3** Iniciadores utilizados para la amplificación del gen de la CS y el gen de la tubulina por la PCR en este estudio.

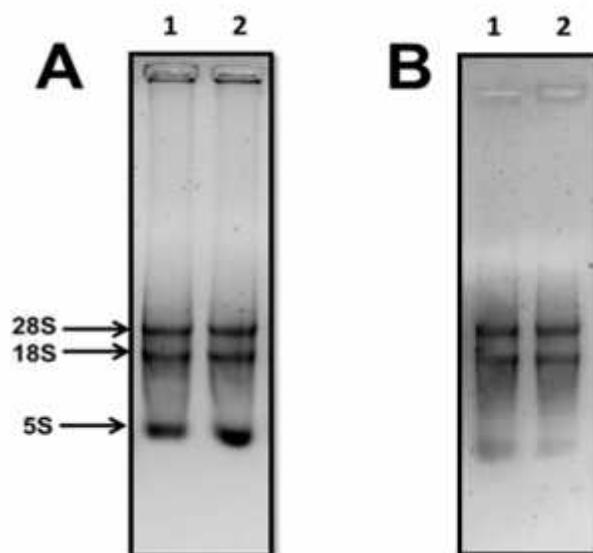
Iniciadores	Secuencia	Longitud (nt)	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño esperado (pb)
FCCS1	TTCATTTGTAAAGAAGATGAATTCGACCAC	30	55	131
RCCS1	GCATAGATTGGAACATTGAAGCTATCC	27	54.3	
CCSFW	CAATGCCCGGCTCTTTCTAC	20	55.9	68
CCSRV	GTAACAAGAGTGTAATAAATGCATGGA	27	53.9	
CCSF-1	TAAGATCCCATTCCCAGAATAC	23	53.1	225
CCSR-1	CTGACTTCTCTGGTTTTTTGG	21	51.9	
CCSF-2	CCAGAATACAGCGATGAACA	20	51.7	211
CCSF-2	CTGACTTCTCTGGTTTTTTGG	21	51.9	
CCSF-3	CCTGTATCCTGCGATGAACA	20	53.7	177
CCSR-3	AACACTATCATAGAAGCCTTTG	22	49.8	
TuB $\alpha$ -FW	GTGCCCAACTGGGTTCAA	18	55.8	209
TuB $\alpha$ -RV	CCTTCTCCATACCTTCACC	20	54.6	

### 4.3. RESULTADOS

#### 4.3.1. Extracción del ARN total

La obtención del extracto de ARN total en las muestras de suspensiones celulares de *C. arabica* L. mantenidas en luz, se llevó a cabo como se describió en la sección 4.2.1 de Materiales y Métodos. El resultado demostró la separación de las subunidades 28S, 18S y 5S del ARNr, indicando que el ARN extraído de las muestras fue de buena calidad (Figura 4.3,A); sin embargo, estos extractos de ARN tuvieron que ser tratados con la enzima DNAasa para eliminar la contaminación del ADN genómico, el cual pudo causar interferencia en la obtención del ADNc (Figura 4.3,B).

Los extractos de ARN obtenidos de células fueron cuantificados y se demostró que estaban a una concentración entre 1200 y 2000 ng/ $\mu$ l. La proporción de la calidad espectral en los extractos fue de 2, de esta manera también se comprobó la obtención de un ARN con buena pureza.



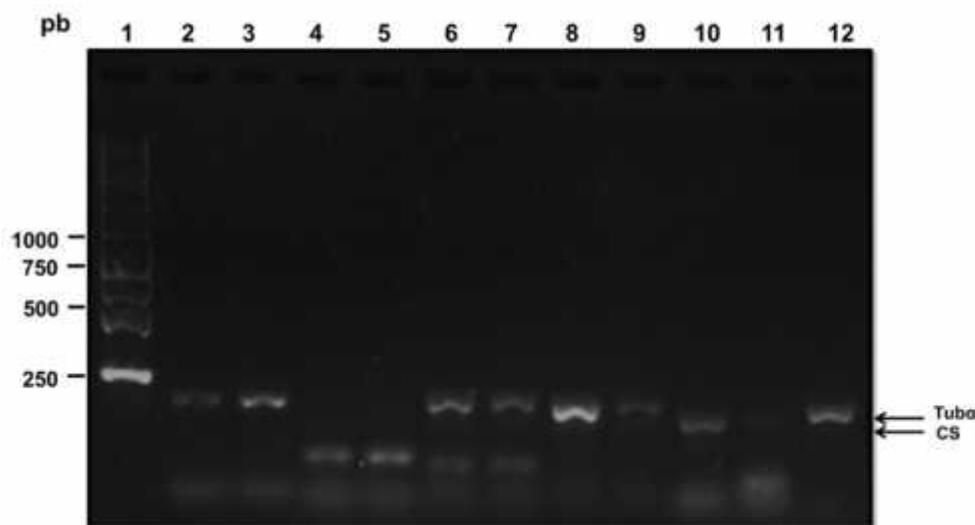
**Figura 4.3** Extracción de ARN total en suspensiones celulares de *C. arabica* L. de 14 días de ciclo de cultivo mantenidas en luz ( $8.3W/m^2$ ). Los extractos de ARN fueron analizados mediante electroforesis. El resultado muestra la separación de las subunidades 28S, 18S, 5S ribosomales. A) Extracción de ARN, (1-2) muestras de ARN (duplicados); B) Muestras de ARN sometidas a tratamientos con DNAasa I por 5 horas. Los geles se prepararon al 1% con agarosa y se tiñeron con solución Gel Red 3X (Biotium).

#### 4.3.2. Selección del iniciador específico para la amplificación del gen CS

Con el objetivo de evaluar la utilidad de los pares de iniciadores diseñados para amplificar el gen de la CS, se desarrolló una reacción de PCR, en la cual se utilizó el ADNc que fue sintetizado del ARN extraído en células de *C. arabica* L., mantenidas en radiación luminosa. Los pares de iniciadores que fueron probados en esta reacción, son los enlistados en el Cuadro 4.1. El ciclo de amplificación de estos iniciadores por PCR punto final y tiempo real, es el que se describió en la sección 4.2.3. Los productos de amplificación fueron separados en una electroforesis en gel de agarosa al 2% y se visualizaron como se mencionó en la sección 4.2.4.

El resultado del experimento descrito en el párrafo anterior, se muestra en la Figura 4.4. El producto de amplificación por PCR del gen CS, obtenido con el uso del par de iniciadores FCCS1/FCCS2, demostró la separación de una banda cercana a los 250 pb, mismo que no estuvo de acuerdo al tamaño esperado de 131 pb. Los pares de iniciadores CCSFW/CCSRV, CCSF1/CCSR1, CCSF2/CCSR1 y CCF3/CCSR3 amplificaron un producto de PCR que se separó de acuerdo al tamaño esperado de 68, 225, 211 y 117 pb respectivamente. Los iniciadores del gen de referencia Tub -FW/ Tub -RV amplificaron un producto de PCR del tamaño esperado a 209 pb. Este primer resultado demostró la amplificación exitosa del gen de la CS; sin embargo, al observar el gel se observa que algunas reacciones de PCR amplificaron hasta 3 bandas, sugiriendo que no todos los iniciadores fueron específicos.

Para demostrar cuales eran los pares de iniciadores ideales para la amplificación del gen de la CS, estos también fueron probados mediante RT-qPCR. El resultado mediante este análisis indicó que de todos los iniciadores diseñados para amplificar el gen de la CS, solo el par CCSFW/CCSRV y CCS-F3/CCS-R3 fueron específicos y no formaron dímeros entre ellos durante la reacción de amplificación. Entre estos dos pares de iniciadores, el par CCS-F3/CCS-R3 fue el que presentó mayor eficiencia durante la reacción de PCR, por eso para llevar a cabo la amplificación del gen que codifica la CS y analizar el nivel de sus transcritos, se decidió utilizar este par de iniciadores.



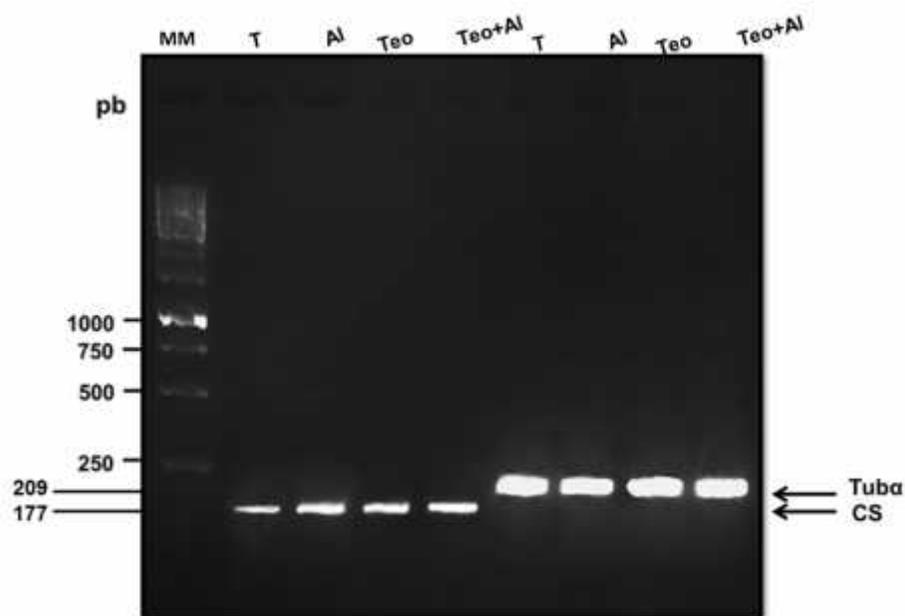
**Figura 4.4** Amplificación del gen de CS a partir del ADNc obtenido de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. En el carril 1: Marcador de peso molecular de 1Kb. El producto de amplificación del gen de la CS con el uso del par FCCS1/FCCS2: carril 2 y 3; CCSFW/CCSRV: carril 4 y 5; CCSF1/CCSR1: Carril 6 y 7; CCSF2/CCSR1: carril 8 y 9; CCSF3/CCSR3: carril 10 y 11. La amplificación del gen de referencia con el uso de los iniciadores Tub FW/Tub RV: carril:12.

#### 4.3.3. Análisis de los niveles de transcritos de la CS mediante PCR punto final

Después de seleccionar el par de iniciadores CCSF3/CCSR3 para amplificar el gen de la CS; se analizó el efecto que genera el  $AlCl_3$  en los niveles de transcritos de este gen, mediante la reacción de PCR punto final. En esta reacción se utilizó el ADNc obtenido de células de *C. arabica* L. que fueron tratadas en ausencia o presencia de  $555 \mu M$  de teobromina por 14 días y que fueron sometidas al tratamiento con  $500 \mu M$  de  $AlCl_3$  por 10 horas.

El resultado de la separación de los productos de PCR punto final, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, se realizó como se describió en la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 4.5 se muestra la separación de los fragmentos correspondientes al marcador molecular de 1Kb. Entre el segundo y el cuarto carril se muestra la separación de un fragmento con un tamaño esperado de 177 pb para el gen de la CS y entre el quinto carril al sexto se muestra el fragmento del gen de referencia de la Tub con una tamaño esperado de 209 pb, observado en cada uno de los tratamientos.

El resultado demostró un incremento en los niveles de transcritos de la CS en las células que fueron tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  y que no fueron adicionadas con teobromina. Este mismo nivel de expresión causado por el  $\text{AlCl}_3$  se observó en las células adicionadas con teobromina, y bajo estas condiciones no se observó cambios causados por el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$ . El resultado indicó que las células en presencia del precursor (teobromina) mantienen altos los niveles de expresión del gen de la CS, por lo cual no es necesario activar un mecanismo de respuesta frente al estrés causado por el  $\text{AlCl}_3$ .



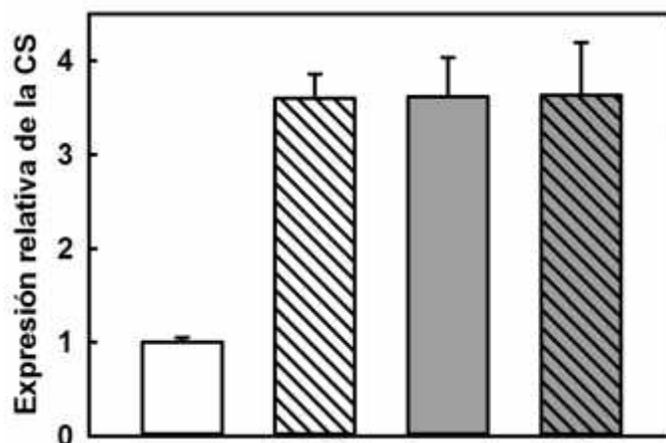
**Figura 4.5** Efecto del  $\text{AlCl}_3$  en el nivel de transcritos de la CS en células de *C. arabica* L. Las células fueron tratadas sin o con teobromina y luego fueron mantenidas por 14 días en radiación luminosa ( $8.3 \text{ W/m}^2$ ), después de este tiempo se llevaron a cabo los tratamientos con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  por 10 horas. Para la amplificación del gen de la CS y el gen de referencia por PCR, se utilizó el par de iniciadores CCS-F3/CCS-R3 y Tub FW/Tub RV respectivamente. MM: marcador de peso molecular de 1 Kb. El producto de PCR se analizó en cada tratamiento. T: testigo; Al:  $\text{AlCl}_3$  (500  $\mu\text{M}$ ); Teo: teobromina (555 $\mu\text{M}$ ); Teo + Al: teobromina (555  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{AlCl}_3$  (500  $\mu\text{M}$ ).

#### 4.3.4. Análisis de los niveles de transcritos de la CS mediante RT-qPCR

Se evaluó el nivel de transcritos de la CS mediante RT-qPCR para comprobar los resultados obtenidos por PCR punto final. Para determinar el efecto que genera el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$  en los niveles de transcritos de la CS en células, se diseñó un experimento similar al descrito anteriormente, en el cual se extrajo ARN y se obtuvo el

ADNc de células de *C. arabica* L. tratadas en presencia o ausencia de teobromina 555  $\mu$ M y mantenidas en radiación luminosa durante 14 días de ciclo de cultivo; estas fueron expuestas con 500  $\mu$ M de  $\text{AlCl}_3$  durante 10 horas, también se generó un tratamiento testigo al que solo se le adicionó un volumen proporcional de agua destilada. Las muestras se utilizaron para obtener el cDNA de los diferentes tratamientos como se describió en la sección 4.2.2 y se llevó a cabo la reacción de la RT-qPCR como se indicó en la sección 4.2.3.

El resultado obtenido se muestra en la figura 4.6. Las células que fueron tratadas con  $\text{AlCl}_3$  o teobromina, incrementaron 2.6 veces los niveles de transcritos de la CS, en comparación con el testigo. Este incremento se mantuvo en las células tratadas con teobromina y  $\text{AlCl}_3$ , lo cual demostró que el tratamiento de las células con  $\text{AlCl}_3$  no generó cambios en los niveles de expresión de la CS en presencia de la teobromina. El resultado sugirió que la teobromina y el  $\text{AlCl}_3$  actúan en un mecanismo de señalización cruzada que regula positivamente la expresión de la CS. Esto traería como consecuencia que las células expuestas con la teobromina se vuelvan insensibles al tratamiento  $\text{AlCl}_3$  en la sobreexpresión de la CS.



**Figura 4.6** Análisis de expresión del gen de la CS mediante RT-qPCR. Las células de *C. arabica* L. fueron tratadas sin o con teobromina y mantenidas por 14 días en luz (8.3  $\text{W}/\text{m}^2$ ), después de este tiempo se llevaron a cabo los tratamientos con 500  $\mu$ M de  $\text{AlCl}_3$  por 10 horas. Para la amplificación del gen de la CS y el gen de referencia por PCR, se utilizó el par de iniciadores CCS-F3/CCS-R3 y Tub FW/Tub RV respectivamente. El producto de PCR se analizó en cada tratamiento. □ : testigo; ▨ :  $\text{AlCl}_3$  (500  $\mu$ M); ■ : teobromina (555 $\mu$ M); ▩ : teobromina (555  $\mu$ M) y  $\text{AlCl}_3$  (500  $\mu$ M). La gráfica representan el resultado de dos experimentos por duplicado  $\pm$  DE. La expresión relativa se calculó en base al método  $2^{-\text{CT}}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

#### 4.4 DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el estudio del transcrito del gen que codifica a la CS en *C. arabica* L., se buscó la secuencia del gen de la CS reportada por Mizuno *et al.* (2003b) y que se encuentra en la base de datos de Gen Bank. Esta secuencia se comparó con el genoma de *C. canephora* y se encontraron 10 secuencias de genes que codifican enzimas *N*-metiltransferasas con un alto porcentaje de identidad al del gen de la CS (Cuadro 4.1). La presencia de todos estos genes en el genoma sugirió hacer un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos que codifican (Figura 4.2), teniendo como objetivo encontrar las proteínas de mayor similitud. Entre las secuencias de genes que codificaron las proteínas de mayor similitud al de la CS, se buscaron las secuencias no conservadas para el diseño de los iniciadores específicos (Cuadro 4.3).

Para amplificar el gen de la CS se utilizó el método de la PCR. En esta reacción se utilizó el ADNc, el cual se obtuvo con el ARN de buena calidad extraído en las células de *C. arabica* L. (Figura 4.3). Los iniciadores específicos para amplificar el gen de la CS y el ADNc fueron utilizados para llevar a cabo la PCR punto final, los productos de esta reacción fueron observados mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 4.4.), en el cual se muestra la separación del gen que codifica a la CS; por otra parte, mediante la RT-qPCR se demostró que solo el par de iniciadores CCSF3/CCSR3 fue eficiente en la reacción para amplificar este gen y no generó dímeros entre los iniciadores.

Luego de establecer las condiciones para amplificar el gen de la CS, se observó el efecto que produce el tratamiento con 500  $\mu$ M de  $\text{AlCl}_3$  en el nivel de transcritos del gen que codifica a la CS en células de *C. arabica* L., que fueron tratadas con o sin teobromina. El resultado de la PCR punto final se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa y se demostró que las células tratadas con  $\text{AlCl}_3$  incrementaron los niveles de expresión de la CS (Figura 4.5). El resultado sugirió que el incremento en la acumulación de cafeína en las células tratadas con  $\text{AlCl}_3$  (Figura 2.7), es dependiente en la expresión del gen de la CS. Esto puede ser correlacionado con lo reportado por Perrois *et al.*, (2014), en donde se indicó que la acumulación de cafeína en especies de *Coffea*, se modula por una regulación a nivel transcripcional.

El experimento que se describió en el párrafo también se comparó mediante RT-qPCR y se observó en el resultado que las células tratadas con  $\text{AlCl}_3$  y/o en presencia de

teobromina incrementaron hasta 2.6 los niveles de transcritos (Figura 4.6). Estos datos demostraron que la regulación de la biosíntesis de la cafeína bajo el estrés del  $\text{AlCl}_3$ , fue a nivel transcripcional. Este incremento en el nivel de expresión del gen de la CS también fue dependiente con el aumento en la actividad enzimática de la CS (Figura 3.1), lo cual ocasionó la inducción de la cafeína (Figura 2.7). Los resultados sugieren un cruzamiento entre las cascadas inducidas por  $\text{AlCl}_3$  y teobromina, las cuales regulan a nivel transcripcional la acumulación de la cafeína en células. Los datos obtenidos pudieron ser correlacionados con lo reportado por otros autores, los cuales indicaron que la regulación transcripcional es uno de mejores pasos regulatorios en la acumulación biológica de la cafeína; entre estos autores, Kumar y Giridhar, (2015) demostraron que el tratamiento de plántulas de cafeto con 50 y 500  $\mu\text{M}$  de ácido salicílico (AS) incrementaron la expresión de los genes que codifican enzimas *N*-metiltransferasas involucradas en la biosíntesis de cafeína.

En otro estudio llevado a cabo en el endospermo del café se demostró que los tratamientos con 50  $\mu\text{M}$  de AS reprimieron el nivel de transcritos de la CS; sin embargo, los tratamientos con 500  $\mu\text{M}$  indujeron el nivel de sus transcritos, y fue consistente con lo obtenido en este estudio bajo el tratamiento de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  en las células. El estrés que genera el aluminio podría afectar la maquinaria transcripcional y traduccional lo que ocasionaría una mayor expresión y síntesis de la enzima como mecanismo de defensa. Esta respuesta podría ser similar al efecto que producen otros factores de estrés como la salinidad y la sequía que generan una respuesta transcripcional de los genes *N*-metiltransferasas las primeras 24 horas de tratamiento en el endospermo de café (Kumar *et al.*, 2015b).

Los resultados obtenidos en este capítulo, permitieron demostrar que el estrés por  $\text{AlCl}_3$  regula positivamente el nivel de transcritos del gen que codifica la CS en células de *C. arabica* L.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN GENERAL

Las plantas tienen la habilidad de reconocer señales ambientales específicas como el ataque biótico y pueden promover rutas de transducción de señales que le permiten la biosíntesis de compuestos de defensa (Okada *et al.*, 2015); entre estos, se encuentran los alcaloides que son uno de los grandes grupos de metabolitos secundarios en plantas económicamente relevantes. En las plantas, los alcaloides tienen actividad biológica de gran importancia y poseen propiedades farmacéuticas. El estudio de los mecanismos de percepción ambiental y la transducción de estas señales externas que activan la ruta de biosíntesis de alcaloides, permite entender el papel ecológico de estos compuestos (Pasquali *et al.*, 2006). En la actualidad, poco se sabe acerca del efecto que genera el estrés por metales en la ruta del metabolismo secundario en plantas. Por lo cual, en este estudio se evaluó la relación entre el estrés por  $\text{AlCl}_3$  y la ruta de biosíntesis de cafeína en suspensiones celulares de *C. arabica* L.

En estudios previos, se ha demostrado que el estrés ambiental como el ataque de patógenos, la radiación luminosa, los iones metálicos, la deficiencia de nutrientes y la temperatura frecuentemente incrementan la acumulación de metabolitos secundarios. Por lo cual, la elicitación se ha utilizado como una estrategia para inducir la síntesis de novo de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de plantas (Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Karuppusamy *et al.*, 2009). Se ha determinado que el ión metálico  $\text{Cu}^{2+}$  tiene un efecto estimulador en la acumulación de betaninas en cultivos de callos de *Amaranthus caudatus*. También se ha observado que el tratamiento con 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  incrementó el contenido de hiosciamina en raíces de *Datura innoxia* (Angelova *et al.*, 2006; Karimi y Khataee, 2012). Estos reportes pudieron ser correlacionados con los resultados obtenidos en este estudio, en donde se logró demostrar que el tratamiento con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  incrementó los niveles de cafeína en las células de *C. arabica* L., observando el pico de acumulación de cafeína a las 10 horas del tratamiento durante la evaluación de un curso temporal (Figura 2.7).

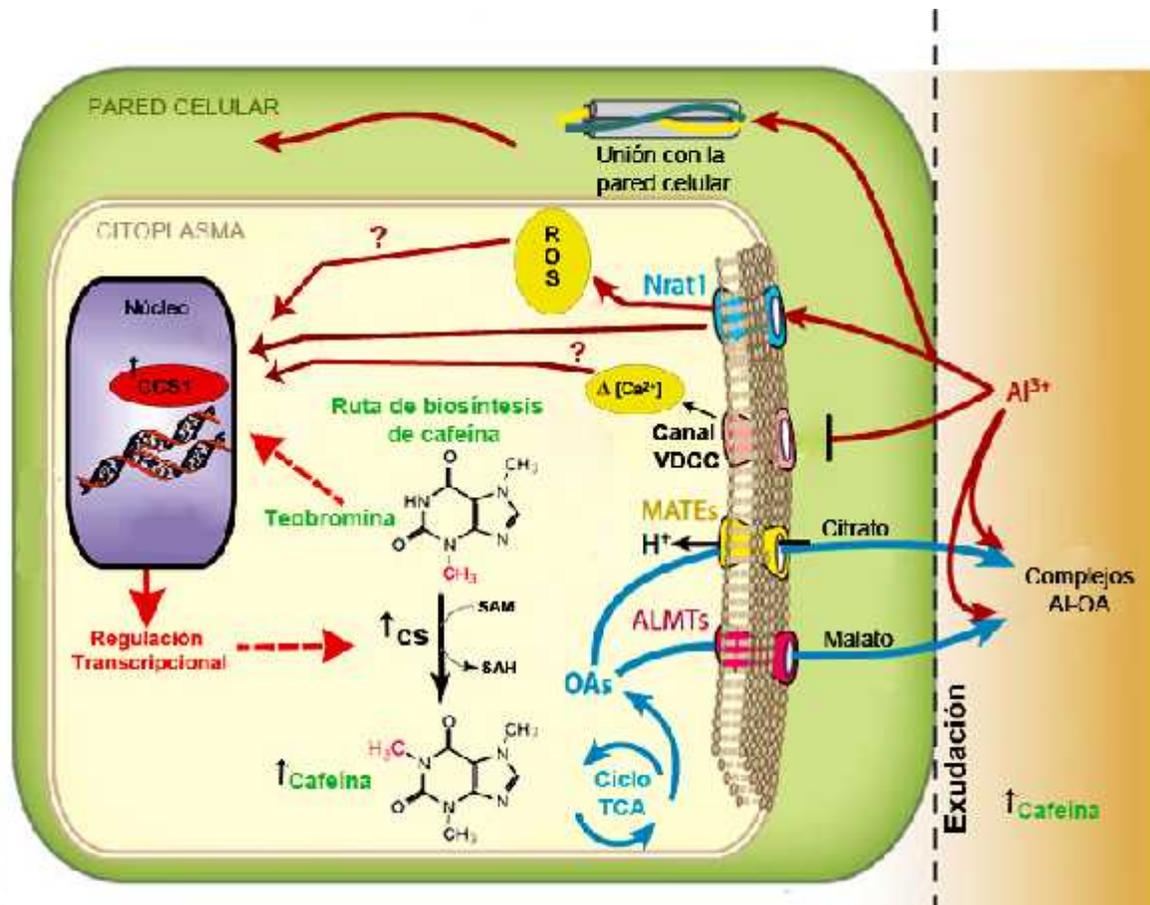
Se ha reportado que el pico de acumulación de la cafeína, se correlaciona con el punto de mayor actividad de la CS en semillas inmaduras de guaraná (Schimpl *et al.*, 2014). En este estudio también se demostró que el incremento de la actividad enzimática de la CS

en células tratadas con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$  (Figura 3.2), esta correlacionado positivamente con el aumento en la acumulación de la cafeína. En adición, el incremento de la actividad de la enzima también se observó en las células adicionadas con teobromina, sin embargo; en estas condiciones, el tratamiento con  $\text{AlCl}_3$  no generó cambios en la actividad de la CS. Los resultados sugirieron que las células tratadas con  $\text{AlCl}_3$  activaron una ruta de señalización que indujo reacciones de defensa, por lo cual se indujo actividad de la enzima que cataliza la producción de cafeína. Por otra parte, la teobromina y el  $\text{AlCl}_3$  podrían actuar como moléculas de señalización en la ruta que regula positivamente la biosíntesis de cafeína; esto explicaría porque las células en presencia de la teobromina son insensibles al tratamiento con  $\text{AlCl}_3$ , en el incremento de la actividad enzimática de la CS y en los niveles de expresión de esta enzima.

Por otra parte, los cambios en los niveles de expresión del gen que codifica a la CS (Figura 4.6), fueron correlacionados coordinadamente con el efecto generado por  $\text{AlCl}_3$  en la actividad enzimática de la CS, bajo las mismas condiciones experimentales. Esto indicó que el estrés por  $\text{AlCl}_3$  puede actuar en una ruta de transducción de señales que regula a nivel transcripcional la biosíntesis de cafeína. La regulación transcripcional de la CS también se ha observado en semillas inmaduras de guaraná, en las cuales se determinó el nivel más elevado de expresión del gen que codifica la CS, el punto de mayor actividad de la enzima y también la mayor acumulación de la cafeína (Schimpl *et al.*, 2014).

En la literatura se ha indicado que el estrés por metales y el estrés biótico pueden compartir moléculas de señalización en común. Esta relación ha sugerido que existe un mecanismo de defensa que involucra la activación de rutas de señalización cruzada en respuesta a ambos tipos de estrés, los cuales pueden incrementar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas últimas podrían actuar en una ruta de señalización que responde a la biosíntesis de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa (Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Poschenrieder *et al.*, 2006). En nuestro grupo de laboratorio, recientemente se ha demostrado que el estrés por  $\text{AlCl}_3$  incrementó la producción de las ROS en células de *C. arabica* L. (datos no publicados). Es por ello que en este estudio, se sugiere que las ROS pudieran ser moléculas de señalización que inducen positivamente la ruta de biosíntesis de cafeína en respuesta al estrés por  $\text{AlCl}_3$ .

Los resultados obtenidos en este estudio fueron integrados en un modelo (Figura 5.1) que muestran el modo de acción que tiene el estrés por  $\text{AlCl}_3$  en la ruta de biosíntesis de cafeína en células de *C. arabica* L. Se puede observar que el  $\text{Al}^{3+}$  regula positivamente la ruta de biosíntesis de la cafeína. Se sugiere que esta regulación pudiera llevarse a cabo mediante la activación de una ruta de transducción de señales, a través de moléculas de señalización inducidas por el estrés del  $\text{Al}^{3+}$  como los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y ROS. La relación entre el estrés por aluminio con la ruta de biosíntesis de cafeína, indicó que este metal puede ser utilizado por las plantas para activar rutas del metabolismo secundario como mecanismo de defensa.



**Figura 5.1** Modelo propuesto del efecto que produce el estrés por  $\text{Al}^{3+}$  en la ruta de biosíntesis de cafeína en células de *C. arabica* L. El  $\text{Al}^{3+}$  puede entrar al citoplasma de la célula a través de un receptor específico del aluminio (Nrat1). Una vez dentro de la célula, el  $\text{Al}^{3+}$  puede activar una ruta de transducción de señales que regula positivamente los niveles de expresión del gen que codifica a la cafeína sintasa (CSS1). Esta respuesta se relaciona coordinadamente con el incremento en la actividad enzimática de la CS y con el aumento en los niveles endógenos y exógenos de cafeína. Por otra parte, el precursor de la biosíntesis de cafeína (teobromina) también pudiera activar un mecanismo de señalización similar al generado por el  $\text{Al}^{3+}$ , lo cual implica una regulación positiva en la ruta de biosíntesis de cafeína. El  $\text{Al}^{3+}$  puede inhibir canales de calcio (VDCC), esto genera un incremento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, este ion y las especies reactivas de oxígeno (ROS) se sugiere que actúan como moléculas de señalización que están relacionados con la regulación positiva en la ruta de biosíntesis de cafeína.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 6.1. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que el estrés producido por el  $\text{AlCl}_3$  incrementó la acumulación de la cafeína en células de *C. arabica* L. Este incremento puede deberse a que el  $\text{AlCl}_3$  actúa como inductor de la CS, porque se observó un aumento en la expresión del gen y en la actividad de esta enzima. En este estudio se logró entender que el control transcripcional de la CS, es un mecanismo clave que está involucrado en la regulación de la biosíntesis de la cafeína, cuando las células están en condiciones de estrés por  $\text{AlCl}_3$ .

También se puede concluir que la acumulación de la cafeína es regulada a nivel transcripcional.

De los resultados generados en este estudio se obtuvieron las siguientes conclusiones:

El estrés generado por  $\text{AlCl}_3$  en las células de *C. arabica* L. incrementa los niveles endógenos y exógenos de la cafeína.

La regulación de la acumulación de la cafeína en las células de *C. arabica* L. cultivadas en presencia de teobromina fue a nivel transcripcional, debido a que sinérgicamente incrementó el nivel del transcrito del gen que codifica a la CS, la actividad enzimática de esta enzima y el nivel de acumulación de la cafeína.

La teobromina y el  $\text{AlCl}_3$  en las células de *C. arabica* L., actúan en un mismo mecanismo de señalización involucrado en el incremento de la actividad enzimática de la CS y en el aumento de los niveles de expresión del gen que codifica esta enzima.

La teobromina exógena generó insensibilidad al tratamiento con  $\text{AlCl}_3$  en las células, tanto en la actividad enzimática de la CS, como en el nivel de los transcritos del gen que codifica a la enzima.

## 6.2. PERSPECTIVAS

Este estudio permitió entender el tipo de regulación transcripcional que se lleva a cabo en la ruta de biosíntesis de cafeína, como respuesta al estrés de 500  $\mu\text{M}$   $\text{AlCl}_3$  en células de *C. arabica* L. Los resultados sugieren que las células inducen la biosíntesis de cafeína como un mecanismo de defensa. Sin embargo, después de obtener estos resultados aún se proponen llevar a cabo otros experimentos que permitan entender los mecanismos de respuesta que involucran la inducción de la cafeína. Por lo tanto se han sugerido llevar a cabo los siguientes experimentos:

Determinar si otras concentraciones de  $\text{AlCl}_3$  inducen la biosíntesis de cafeína, por lo cual se evaluaría el tratamiento dosis-respuesta de diferentes concentraciones de  $\text{AlCl}_3$  en la acumulación de la cafeína en suspensiones celulares de *C. arabica* L.

Determinar cuál de las cafeínas sintetas presentes en el genoma de *C. arabica* L., responde positivamente en la ruta de biosíntesis de cafeína, por lo cual se deberá purificar a la proteína.

Estudiar el transcriptoma y el proteoma de células de *C. arabica* L. bajo el estrés del  $\text{AlCl}_3$ , para observar cuales son los genes y proteínas clave que son regulados en la inducción de la cafeína.

Evaluar si la concentración de compuestos fenólicos están involucrados en la retención o exudación de la cafeína en células de *C. arabica* L. en respuesta al estrés por  $\text{AlCl}_3$ .

**BIBLIOGRAFÍA**

- Adler, S., Mouille, G., Fock-Bastide, I., Citerne, S. y Noirot, M. (2016). Comparison between *Coffea arabica* L. 'Laurina' and *C. arabica* 'Bourbon' seedlings grown in daylight or darkness for their polysaccharidic cell wall composition and caffeine and chlorogenic acid contents. *Trees*, 30, 665-674.
- Alvarado, M., y Rojas G. (2007). Cultivo y beneficiado del café. Editorial Universidad Estatal a Distancia, San José Costa Rica. pp. 184.
- Angelova, Z., Georgiev, S. y Roos W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipamente*, 20, 72-83.
- AMECAFÉ. (2013). Asociación Mexicana de la Cadena Productiva de Café. [Online] (Actualizado 3 de octubre, 2014) Disponible en: <http://amecafe.org.mx/> [Acceso 6 junio 2016].
- Ashihara, H., y Crozier, A. (1999). Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *coffea*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 3425-3431.
- Ashihara, H., Kato, M., y Crozier, A. (2011). Distribution, biosynthesis and catabolism of methylxanthines in plants, en: *Methylxanthines*, Ashihara H., y Kato, M. (eds.). Springer. Berlin, Heidelberg. pp. 11-31.
- Ashihara, H., Monteiro, A. M., Gillies, F. M. y Crozier, A. (1996). Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant physiology*, 111, 747-753.
- Ashihara, H., y Crozier, A. (2001). Caffeine: A well known but little mentioned compound in plant science. *Trends in Plant Science*, 6, 407-413.
- Ashry, N. A., y Mohamed, H. I. (2014). Impact of secondary metabolites and related enzymes in flax resistance and/or susceptibility to powdery mildew. *African Journal of Biotechnology*, 11, 1073-1077.

- Aspiazu, K., Navarro, J., y Mendoza, O. (2009). Proyecto de comercialización del café de habas (café organico), actuando como Intermediario, para el consumo local en la ciudad de guayaquil y como una opción de exportación. Tesis de licenciatura, Escuela Superior Politécnica del litoral, Ecuador. pp. 95.
- Barsalobres-Cavallari, C., Severino, F.E., Maluf, M.P. y Maia, I.G. Identification of suitable internal genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. *BMC Molecular Biology*, 10, 1-11.
- Baumann, T.W., y Frischknecht, P.M. (1988). Caffeine: production by plant (*Coffea* spp.) cell cultures, en: *Biotechnology in agriculture and forestry*, Y.P.S Bajaj. Springer verlag (ed.). Heidelberg, pp. 264-281.
- Baumann, T.W., Koetz, R., y Morath, P. (1983). N-methyltransferase activities in suspension cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Reports*, 2, 33-35.
- Bazzo, B.R., Eiras A.L., DeLaat D.M., SiqueiraW.S., Mondego J.M. y Colombo C.A. (2013). Gene expression analysis suggest temporal differential response to aluminum in *Coffea arabica* cultivars. *Tropical Plant Biology*, 6, 191-198.
- Bejan, C., y Visoiu, E. (2011). Resveratrol biosynthesis on *in vitro* culture conditions in grapevine (cv. Feteasca Neagra and Cabernet Sauvignon) under the action of  $AlCl_3$  as elicitor agent. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6).
- Berríos, M. d. J. F. (1983). Fundamentos botánicos ecológicos y fisiológicos del cultivo del café y su relación en la productividad de una finca, en: *Técnicas modernas para el cultivo del café*, ISIC (ed). El salvador. pp. 5-16.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., y Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839-851.
- Branquinho, C., Serrano, H. C., Pinto, M. J., y Martins-Loução, M. A. (2007). Revisiting the plant hyperaccumulation criteria to rare plants and earth abundant elements. *Environmental Pollution*, 146, 437-443.

- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., y Vickers, K. (2014). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. pp. 1367.
- Burke, L. (2009). Nutricion en el deporte / Nutrition in Sport: Un Enfoque Practico / a Practical Approach. Editorial Médica Panamericana, España. pp. 536.
- Chen Q., Wu K.H, Wang P., Yi J., Li K.Z., Yu Y.X. y Chen L.M. (2013). Overexpression of MsALMT1, from the aluminum-sensitive *Medicago sativa*, engances malate exudation and aluminum resistance in tabacco. Plant Molecular Biology Reporter, 31, 769-774.
- Chen, M., Cui, W., Zhu, K., Xie, Y., Zhang, C., y Shen, W. (2014). Hydrogen-rich water alleviates aluminum-induced inhibition of root elongation in alfalfa via decreasing nitric oxide production. Journal of Hazardous Materials, 267, 40-47.
- Contreras, A., Hernández-Martínez, G., y Sánchez, S. L. (2008). Qué bien huele, mejor sabrá: la organización de productores del proyecto Biocafé. Instituto de Ecología, A.C., México. pp. 140.
- Da Silva, E. A., Toorop, P. E., van Aelst, A. C., y Hilhorst, H. W. (2004). Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. Planta, 220, 251-261.
- Denoeud, F. *et al.*, (2014). The coffea genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. Science, 345, 1181-1184.
- Díaz, A. (2011). Estimaciones de los efectos del cambio climático sobre la roya (*Hemileia vastatrix*) y la broca (*Hyoothenemus hampei*) del cafeto en la región de Coatepec, Veracruz. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 84.
- Dixon R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. Nature, 411, 843-847
- Echeverri, D., Buitrago, L., Montes, F., Mejía, I., y González, M. d. P. (2005). Café para cardiólogos. Revista Colombiana de Cardiología, 11, 357-365.

- 
- Escamilla, P., Ruiz, R., Díaz, P., Landeros, S., Platas, R., Zamarripa, C., y González, H. (2005). El agroecosistema café orgánico en México. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica), 76, 5-16.
- Famoso, A.N., Clark, R.T., Shaff, J.E., Craft, E., McCouch, S.R. y Kochian, L.V. (2010). Development of a novel aluminum tolerance phenotyping platform used for comparisons of cereal aluminum tolerance and investigations into rice aluminum tolerance mechanisms. *Plant physiology*, 153, 1678-1691.
- Favrod-Coune, T. y Broers, B. (2015). Addiction to caffeine and other xanthines, en: textbook of addiction treatment: International perspectives, el-Guebaly *et al.* (eds.). Springer Milan. Milano. pp. 437-453.
- Foy, C. D. (1984). Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soils. *Soil Acidity and Liming*. 57-97.
- Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., y Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51, 83-133.
- Frischknecht, P.M., y Baumann, T.W. (1980). The pattern of purine alkaloid formation in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Planta Medica*, 40, 245-249.
- Frischknecht, P.M., y Baumann, T.W. (1985). Stress induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, 24, 2255-2257.
- Fujimori, N., Suzuki, T., y Ashihara, H. (1991). Seasonal variations in biosynthetic capacity for the synthesis of caffeine in tea leaves. *Phytochemistry*, 30, 2245-2248.
- Goedert, W.J., E. Lobato, y S. Lourenco. (1997). Nutrient use efficiency in Brazilian acid soils: nutrient management and plant efficiency, en: *Plant-soil Interactions at low pH*. Moniz, A.C. et al. (eds.). Brazilian Soil Science Society. pp. 97-104.
- Górska, A.M. y Gołombiowska, K. (2015). The role of adenosine A1 and A2A receptors in the caffeine effect on MDMA-Induced DA and 5-HT release in the mouse striatum. *Neurotoxicity Research*, 27, 229-245.

- 
- Greenwood, N. N., y Earnshaw, A. (1997). Chemistry of the Elements: Elsevier. pp. 1305.
- Grob, K., Lanfranchi, M., Egli, J., y Artho, A. (1990). Determination of food contamination by mineral oil from jute sacks using coupled LC-GC. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 74, 506-512.
- Häkkinen, S.T., Ritala, A., Rischer, H. y Oksman-Caldentey, K.-M. (2012). Medicinal plants medicinal plant, Engineering of Secondary Metabolites cell/cellular cultures secondary metabolites in cell cultures cell/cellular cultures, En: encyclopedia of sustainability science and technology, Meyers R. (ed.). Springer New York. pp. 6519-6538.
- Hede, A.R., Skovmand, B., y López-Cesati, J. (2001). Application of physiology in wheat breeding. Reynolds, en: acid soil and aluminum toxicity, M.P., Ortiz-Monasterio, J.I., y McNab (eds.). México, D.F: CIMMYT. pp. 172-182
- Imaginalgo, 2016. El café [Online] (Actualizado 22 abril 2016) Disponible en: <http://geraldineo valle.com/escrito-07.html> [Acceso 6 enero 2016]
- INFOAGRO, 2002. El cultivo de café (1a parte)[Online](Actualizado 13 mayo 2016). Disponible en: <http://www.infoagro.com/herbaceos/industriales/cafe.htm> [Acceso 2 junio 2016].
- Karimi, F., y Khataee, E. (2012). Aluminum elicits tropane alkaloid production and antioxidant system activity in micropropagated *Datura innoxia* plantlets. Acta Physiologiae Plantarum, 34, 1035-1041.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research, 3, 1222-1239.
- Kato, M., Kanehara, T., Shimizu, H., Susukí, T., Gillies, F.M., Crozier, A., y Ashihara, H. (1996). Caffeine biosynthesis in young leaves of camellia sinensis: *in vitro* studies on N-methyltransferase activity involved in the conversion of xanthosine to caffeine. Physiologia plantarum, 98, 629-636.

- Kato, M. y Mizuno, K. (2004). Caffeine synthase and related methyltransferases in plants. *Frontiers in Bioscience*, 1, 1833-1842.
- Kato, M., Mizuno K., Crozier, A., Fujimura, T. y Ashihara, H. (2000). A gene encoding caffeine synthase from tea leaves. *Nature*, 406, 956-957.
- Kato, M., Mizuno, K., Fujimura, T., Iwama, M., Irie, M., Crozier, A. y Ashihara, H. (1999). Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiology*, 120, 579-586.
- Kochian, L.V., Piñeros, M.A., Liu, J., y Magalhaes, J.V. (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 571-598.
- Koshiishi, C., Ito, E., Kato, A., Yoshida, Y., Crozier, A., y Ashihara, H. (2000). Purine alkaloid biosynthesis in young leaves of *Camellia sinensis* in light and darkness. *Journal of Plant Research*, 113, 217-221.
- Koshiishi, C., Kato, A., Yama, S., Crozier, A., y Ashihara, H. (2001). A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilisation of adenosine released from the S - adenosyl- L -methionine cycle. *FEBS Letters*, 499, 50-54.
- Koshiro, Y., Zheng, X.-Q., Wang, M.-L., Nagai, C., y Ashihara, H. (2006). Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* fruits. *Plant Science*, 171, 242-250.
- Koyama, Y., Tomoda, Y., Kato, M. y Ashihara, H. (2003). Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 977-984.
- Kumar, A., Naik, G.K, Simmi, P.S. y Giridhar, P., (2015b). Salinity and drought response alleviate caffeine content of Young leaves of *Coffea canephora* var. Robusta cv. S274. *Journal of Applied Biologt & Biotechnology*. 3, 50-60.

- Kumar, A., Simmi, P.S., Naik, G.K, Giridhar, P., (2015a). RP-HPLC and transcript profile indicate increased leaf caffeine in *Coffea canephora* plants by light. *Journal of Biology and Earth Sciences*, 5, 1-9.
- Kumar, A., y Giridhar, P. (2015). Salicylic acid and methyljasmonate restore the transcription of caffeine biosynthetic N-methyltransferases from a transcription inhibition noticed during late endosperm maturation in coffee. *Plant Gene*, 4, 38-44.
- Kurata, H., Achioku, T., y Furusaki, S. (1998). The light/dark cycle operation with an hour-scale period enhances caffeine production by *Coffea arabica* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 518-523.
- Kurata, H., Matsumura, S., y Furusaki, S. (1997). Light irradiation causes physiological and metabolic changes for purine alkaloid production by a *Coffea arabica* cell suspension culture. *Plant Science*, 123, 197-203.
- Kurata, H., Seki, M., Furusaki, S., & Furuya, T. (1990). Effect of light on caffeine production by plant cells of *Coffea arabica*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 613, 538-541.
- Kvande, H. (2008). Two hundred years of aluminum... or is it aluminium? *The Journal Minerals, Metals & Materials Society*, 60, 23-24.
- Li, C., Zhu, Y., Yu, Y., Zhao, Q., Wang, S., Wang, X., Yao, M., Luo, D., Li, X., Chen, L., y Yang, Y. (2015). Global transcriptome and gene regulation network for secondary metabolite biosynthesis of tea plant (*Camellia sinensis*). *BMC Genomics*, 16, 1-21.
- Li, J.Y., Liu, J., Dong, D., Jia, X., McCouch, S.R., y Kochian, L.V. (2014). Natural variation underlies alterations in Nramp aluminum transporter (NRAT1) expression and function that play a key role in rice aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 6503-6508.
- Liu, J., Magalhaes, J. V., Shaff, J., y Kochian, L. V. (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminum tolerance. *The Plant Journal*, 57, 389-399.

- 
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-CT}$  method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lozano, R. P. García, Y.A., Tafalla, D.B., Albaladejo, M.F. (2007). Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso. *Adicciones*, 19, 225-238.
- Ma, J. F., Ryan, P. R., y Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6, 273-278.
- Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S., y Matsumoto, H., (1997). Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature*, 390, 569-570.
- Madlung, A., y Comai, L. (2004). The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany*, 94, 481-495.
- Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P. y Becker, K. (2007). Alkaloids, en: *Plant secondary metabolites*, Makkar *et al.* (eds.). Humana press. Totowa, New Jersey. pp. 107-111.
- Maniega, I., Molero, L., Perea, A., y Pérez, G. (2009). Actividad alelopática de la cafeína en plántulas de trigo y lenteja. *Ambiociencias*, 4, 29-36.
- Marschner, H. (2012). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier, London. pp. 651.
- Martínez-Estévez, M., Muñoz-Sánchez, J., Loyola-Vargas, V., y Hernández-Sotomayor, S.M.T. (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Reports*, 20, 469-474.
- Masulili, A., Utomo, W. H., y Syechfani, M. (2010). Rice husk biochar for rice based cropping system in acid soil 1. The characteristics of rice husk biochar and its influence on the properties of acid sulfate soils and rice growth in West Kalimantan, Indonesia. *Journal of Agricultural Science*, 2, 39.
- Matonyei, T.K., Cheprot, R.K., Liu, J., Piñeros, M.A., y Shaff, J.E. (2014). Physiological and molecular analysis of aluminum tolerance in selected Kenyan Maize lines. *Plant Soil*, 377, 357-367.

- Matsuura, H.N. y Fett-Neto, A.G. (2015). Plant alkaloids: Main features, toxicity, and mechanisms of action, en: Plant toxins, Gopalakrishnakone P. *et al.* (eds.). Springer Netherlands. Dordrecht. pp. 1-15.
- Mazzafera, P., Crozier, A. y Sanberg, G. (1994). Studies on the metabolic control of caffeine turnover in developing endosperms and leaves of *Coffea arabica* and *Coffea dewevrei*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1423-1427.
- Mazzafera, P. y Silvarolla, B. (2010). Caffeine content variation in single green arabica coffee seeds. *Seed Science Research*, 20, 163-167.
- McCarthy, A., y McCarthy, J. (2007). The structure of two N-methyltransferases from caffeine biosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 144, 879-889.
- Meyer, F. (1965). Notes on wild *Coffea arabica* from southwestern ethiopia, with some historical considerations. *Economic Botany*, 19, 136-151.
- Mizuno, K., Kato, M., Irino, F., Yoneyama, N., Fujimura, T., y Ashihara, H. (2003a). The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Letters*, 547,56-60.
- Mizuno, K., Okuda, A., Kato, M., Yoneyama, N., Tanaka, H., Ashihara, H., y Fujimura, T. (2003b). Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Letters*, 534, 75-81.
- Muñoz-Sánchez, J. A., Chan-May, A., Cab-Guillén, Y., y Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2013). Effect of salicylic acid on the attenuation of aluminum toxicity in *Coffea arabica* L. suspension cells: A possible protein phosphorylation signaling pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128, 188-195.
- Muñoz-Sánchez, J.A., Domínguez-Domínguez, E.R., y Sotomayor-Hernández S.M.T. (2015). Characterizing the relationship between aluminum content and pH in coffee (*Coffea arabica* L.) crop soils in Mexico. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 8, 39-46.

- Murthy, H.N., Lee, E.J. y Paek, K.Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 118, 1-16.
- Muthaiya, M.J., Nagella, P., Thiruvengadam, M. y Mandal, A.A. (2013). Enhancement of the productivity of tea (*Camellia sinensis*) secondary metabolites in cell suspension cultures using pathway inducers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 16, 143-149.
- Nájera, E.Ü. (2002). El café orgánico en México: una alternativa para los productores indígenas en la economía globalizada. Cuadernos de desarrollo Rural. México. pp. 75.
- Negishi, T., Oshima, K., Hattori, M., Kanai, M., Mano, S. y Nishimura, M. (2012). Tonoplast- and plasma membrane-localized aquaporin-family transporters in blue hydrangea sepals of aluminum hyperaccumulating plant. *PLoS One* 7:e43189.
- Nehlig, A. (2013). Coffee drinking, effects of caffeine, en: *Encyclopedia of behavioral medicine*, Gellman y Turner (eds.). Springer New York. pp. 433-441.
- Nelson, D.L., y Cox, M.M. (2013). Biosignaling, en: *Lehninger principles of biochemistry*, Freeman and company W.H. (eds.). Macmillan higher education. New York. pp. 433-504.
- Nishimura, O., y Mihara, S. (1990). Investigation of 2-hydroxy-2-cyclopenten-1-ones in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1038-1041.
- Ogawa, M., Herai, Y., Koizumi, N., Kusano, T., y Sano, H., (2001). 7-methylxanthine methyltransferase of coffee plants. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 8213-8218.
- Okada, K., Abe, H. y Arimura, G. (2015). Jasmonates induce both defense responses and communication in monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell Physiology*, 56, 16-27.

- Ozyigit, I. I., Vardar, F., Yasar, U., y Akinci, S. (2013). Long-term effects of aluminum and cadmium on growth, leaf anatomy, and photosynthetic pigments of cotton. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 44, 3076-3091.
- Pacheco, A., y Pohlan, H. A. J. (2005). Plantas aromáticas como cultivo intercalado, experiencias y efectos alelopáticos sobre el café (*Coffea arabica* L.). Congreso Internacional De Plantas Medicinales, 207-216.
- Pasquali, G., Porto, D.D., Fett-Neto, A.G. (2006). Metabolic engineering of cell cultures versus whole-plant complexity in the production of bioactive monoterpene índole alkalid: recent progress related to old dilemma. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 287-296.
- Pech-Kú, R. (2014). Efecto del aluminio en los niveles de cafeína en suspensiones celulares y plántulas de *Coffea arabica* L. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Mérida, México. pp. 70.
- Peña, J. R. A. (2011). Manual de Histología Vegetal, Paraninfo, México. pp. 326.
- Pérez P, J. R., y Díaz C, S. (2000). El café, bebida que conquistó al mundo, Libros UACH, México. pp.151
- Pérez, M. P. Y. (1997). Biblioteca de la agricultura: Técnicas agrícolas en cultivos extensivos, Idea books. pp. 154.
- Perrois, C., Strickler, S.R., Mathieu, G., Lepelley, M., Bedon, L., Michaux, S., Husson, J., Mueller, L., y Privat, I. (2014). Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). *Planta*, 241, 179-191.
- Pineros, M., Magalhaes, J., Carvalho-Alves, V.M. y Kochian, L.V. (2002). The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. *Plant Physiol*, 29, 1194–1206.
- Plant curator, 2014. 115 free vitange medicinal plant illustrations [Online] (Actualizado 16 mayo 2014). Disponible en: <http://plantcurator.com/115-free-medicinal-plant-illustrations/> [Acceso 20 enero 2015].

- Pompelli, M. F., Pompelli, G. M., de Oliveira, A. F., y Antunes, W. C. (2013). The effect of light and nitrogen availability on the caffeine, theophylline and allantoin contents in the leaves of *Coffea arabica* L. *Aims Environmental Science*, 1, 1-11.
- Poschenrieder, C., Tolrá, R. y Barceló. (2006). Can metals defend plants against biotic stress?, *Trends In Plant Science*, 11, 288-295.
- Poschenrieder, C., Gunse, B., Corrales, I. y Barcelo, J. (2008). A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the Total Environment*, 400, 356–368.
- Poschenrieder, C y Barceló J. (2013). Aluminum in plants, en: *Encyclopedia of metalloproteins*, Uversky V.N. *et al.* (eds.). Springer Science. New York. pp. 34-38.
- Ramakrishna, A., y Ravishanka, G.R. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Behavior*, 6, 1720-1731.
- Rao, I. M., Zeigler, R. S., Vera, R., y Sarkarung, S. (1993). Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. *BioScience*, 43, 454-465.
- Roosen, N., y VanderHoff, F. (2002). La aventura del comercio justo. Una alternativa de la globalización por los fundadores de Max Havelaar. *El atajo ediciones*, México. pp. 231.
- Roberts, M.F., y Waller, G.R. (1979). *N*-methyltransferase and 7-methyl-*N*<sup>8</sup>-nucleosidase hydrolase activity in *Coffea arabica* and the biosynthesis. *Phytochemistry*, 18, 451-455.
- Rout, G., Samantaray, S., y Das, P. (2001). Aluminium toxicity in plants: a review. *Agronomie*, 21, 3-21.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., y Jones, D.L. (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology*, 52, 527–560.
- Ryan, P.R., Raman, H., Gupta, S., Horst, W.J. y Delhaize, E. (2009). A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiology*, 149, 340–351.

- 
- Sartor, R.M., y Mazzafera, P. (2000). Caffeine formation by suspension cultures of *Coffea dewevrei*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43, 61-69.
- Schimpl, F.C., Kiyota, E., Mayer, J.L.S., Gonçalves, J.F.C., Da Silva, J.F., y Mazzafera, P. (2014). Molecular and biochemical characterization of caffeine synthase and purine alkaloid concentration in guarana fruit. *Phytochemistry*, 105, 25-36.
- Schlatmann, J., Hoopen, H., y Heijnen, J. (1996). Large-Scale Production of Secondary Metabolites by plant cell cultures. *Plant Cell Culture Secondary Metabolism: Toward Industrial Application*, 11-52.
- Schulthess, H., y Baumann, T. (1995). Stimulation of caffeine biosynthesis in suspension-cultured coffee cells and the in situ existence of 7-methylxanthosine. *Phytochemistry*, 38, 1381-1386.
- Shamsi I.H., Ali E., Jiang L., Liu W., Sun C., Jin C. y Lin X. (2013). Plant cell signaling in metal stress, en: stress signaling in plants: genomics and proteomics perspective, Sarwat *et al.* (eds.). Springer, New York. pp. 169-190.
- Shimoda, M., y Shibamoto, T. (1990). Isolation and identification of headspace volatiles from brewed coffee with an on-column GC/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 802-804.
- Smith, P.K., Krohn., R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Söndahl, M., y Sharp, W. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 81, 395-408.
- Spollansky, T. C., Pitta-Alvarez, S. I., y Giuliotti, A. M. (2000). Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 31-32.

- Sreenivasulu, N., Sopory, S.K., y Kavikishor P.B. (2007). Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. *Gene*, 388, 1-13.
- Suzuki, T., y Takahashi, E. (1975). Biosynthesis of caffeine by tea-leaf extracts. *Biochemical Journal*, 146, 87-96.
- Suzuki, T., y Waller, G.R. (1984). Biodegradation of caffeine: formation of theophylline and caffeine in mature *Coffea arabica* fruits. *Journal of Science and Food Agriculture*, 35, 66-70.
- Suzuki, T., Ashihara, H. y Waller, G.R. (1992). Purine and purine alkaloid metabolism in camellia and coffee plants. *Phytochemistry*, 31, 2575-2584.
- Taiz, L., y Zeiger E. (2007). *Fisiología vegetal*. Universitat Jaume, España. pp. 1338
- Terada, H., Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K., y Sakabe, Y. (1985). Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in coffee beans and coffee products. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 69, 960-964.
- Tikhonov, A.N. (2013). pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 116, 511-534.
- Tolrá, R., Barcelo, J., y Paschenrieder, C. (2009). Constitutive and aluminum-induced patterns of phenolic compounds in two maize varieties differing in aluminum tolerance. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 1486-1490.
- Uefuji, H., Ogita, S., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., y Sano, H. (2003). Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant Physiology*, 132, 372-380.
- Valadez-González N., Colli-Mull J.G., Brito-Argáez L., Muñoz-Sánchez J.A., Aguilar J.J., Castaño E. y Hernández-Sotomayor S.M.T. (2007). Differential effect of aluminum on DNA synthesis and CDKA activity in two *Coffea arabica* cell lines. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 69-77.

- Vaughan, R., Conn, C., y Mermier, C.M. (2014). Effects of commercially available dietary supplements on resting energy expenditure: a brief report. *ISRN Nutrition*, 2014, 1-14.
- Viani, R. (1991). The composition of coffee. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 39, 1770-1772.
- Vieira, H. (2008). *Coffee: the plant and its cultivation*. Springer, Netherlands. pp. 3-18.
- Von, Uexküll, H. R., y Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil*, 171, 1-15.
- You, J.F., Hou N.N., Xu M.Y., Zhang H.M., y Yang Z.M. (2010). Citrate transporters play an important role in regulating aluminum-induced citrate secretion in *Glycine max*. *Biologia Plantarum*, 54, 766-768.
- Yue, Y., y Guo H. (2014). Quantum mechanical/molecular mechanical study of catalytic mechanism and role of key residues in methylation reactions catalyzed by dimethylxanthine methyltransferase in caffeine biosynthesis. *Journal of Chemical Information Modeling*, 54, 593-600.
- Zetina, L., Pastrana, A., Romero, M., y Jiménez, C. J. (2002). Manejo de suelos ácidos para la región tropical húmeda de México. Centro de Investigación regional del Golfo Centro. Campos Experimentales de Papaloapan y Huimanguillo. INIFAP, México .pp. 170.
- Zhang, Q., Cao, Z., Sun, X., Zuang, W., y Li, Y. (2016). Aluminum trichloride induces hypertension and disturbs the function of erythrocyte membrane in male rats. *Biological Trace Element Research*, 171, 116-123.
- Zheng, X.Q., Ye, C.X, Kato, M., Crosier, A., y Ashihara, H. (2002). Theacrine (1,3,7,9-tetramethyluric acid) synthesis in leaves of a *Chinese tea*, kucha (*Camellia assamica* var. kucha). *Phytochemistry*, 60, 129-134.

Zubieta, C., Ross, J.R., Koscheski, P., Yang, Y., Pichersky, E., y Noel, J.P. (2003). Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell*, 15, 1704-1716.