



**Universidad Autónoma de Guerrero
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Facultad de Ciencias de la Tierra**

MAESTRÍA EN BIOCIENCIAS

**Actividad antioxidante y efecto protector de *Ficus crocata*
sobre el daño oxidativo inducido por H₂O₂ en células HaCaT**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BIOCIENCIAS**

P R E S E N T A:

QBP Brenda de la Cruz Concepción

Director de tesis: Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán

Codirectora de tesis: Dra. Mónica Espinoza Rojo



Chilpancingo de los Bravo, Gro.

Marzo de 2019

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 11 días del mes de enero de dos mil diecinueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada "Actividad antioxidante y efecto protector de *Ficus crocata* sobre el daño oxidativo inducido por H_2O_2 en células HaCaT", presentada por el alumna **Brenda de la Cruz Concepción**, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

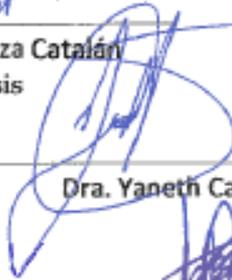
El Comité Tutorial



Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán
Dirección de tesis



Dra. Ma. Elena Moreno Godínez



Dra. Yaneth Castro Coronel



Dra. Patricia Álvarez Fitz



Dra. Ivonne M. Olivares Corichi



Dra. Natividad Castro Alarcón
Coordinadora de la maestría en
Biociencias de la FCQB.



Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular, el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, el Laboratorio de Biomoléculas y en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental; todos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro).

Bajo la dirección del:

Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán

La codirección de:

Dra. Mónica Espinoza Rojo

Y la asesoría de:

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

Dra. Patricia Álvarez Fitz

Dra. Yaneth Castro Coronel

Dra. Ivonne Ma. Olivares Corichi.

Durante el periodo en que la C. Brenda de la Cruz Concepción cursó la Maestría en Biociencias recibió beca del CONACyT (número de registro 829255).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán, investigador, asesor y persona extraordinaria. Por su valiosa amistad, por haberme brindado la confianza y su apoyo constante e incondicional en la realización de este proyecto.

A la Dra. Mónica Espinoza Rojo, excelente persona y asesora. Por su confianza, por fomentar en mí el deseo de superación, por su dedicación y apoyo absoluto para la realización de este proyecto.

A la Dra. Patricia Álvarez Fitz por su valiosa asesoría y completa disposición, por compartir conmigo sus conocimientos y su tiempo para la elaboración de este proyecto.

A la Dra. Ma. Elena Moreno Godínez, la Dra. Yaneth Castro Coronel y la Dra. Ivonne María Olivares Corichi, por sus aportaciones en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ana Elvira Zacapala Gómez por su amistad, por permitirme trabajar a su lado, por su ayuda incondicional y su completa disposición en compartir sus conocimientos conmigo.

A mis compañeros de Laboratorio de Biomedicina Molecular y del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, por su amistad, su calidez, por los momentos compartidos y su apoyo durante estos dos años.

DEDICATORIAS

A mi madre, por estar a mi lado siempre, por apoyarme incondicionalmente en todo lo que me propongo, por impulsarme a continuar y a no rendirme en el camino hacia mis objetivos.

A mis hermanas por apoyarme en todo momento y por permanecer siempre pendientes de mí.

A mis compañeros de la maestría en Biociencias de la generación 2017-2019, por su valiosa amistad, por los momentos compartidos y por haber hecho tan amena mi estancia a su lado.

ÍNDICE

	Pág.
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Métodos.....	3
Resultados y discusión.....	6
Conclusiones.....	15
Declaración de conflictos de interés.....	15
Agradecimientos.....	15
Referencias.....	15
Anexos.....	19

Actividad antioxidante y efecto protector de *Ficus crocata* sobre el daño oxidativo inducido por H₂O₂ en células HaCaT

De la Cruz-Concepción Brenda ^{a, b}, Espinoza-Rojo Mónica ^b, Álvarez-Fitz Patricia ^c, Moreno-Godínez Ma. Elena ^d, Castro-Coronel Yaneth ^e, Olivares-Corichi Ivonne María ^f, Mendoza-Catalán Miguel Ángel ^{a*}.

^a Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero, México.

^b Laboratorio de Biología Molecular y Genómica, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero, México.

^c Cátedras CoNaCyT-UAGro. Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero, México.

^d Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental, Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero, México.

^e Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero, México.

^f Escuela de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

*Autor correspondiente: Miguel Ángel Mendoza Catalán. Laboratorio de Biomedicina Molecular, Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria, Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México. E-mail: mglmendoza7@gmail.com. Tel: 7471240822.

Resumen

Los antioxidantes naturales son utilizados para prevenir el daño oxidativo y alteraciones relacionadas. El género *Ficus* ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes, *Ficus crocata* es una especie de amplia distribución en México utilizada en la medicina tradicional para el control de algunas enfermedades, sin embargo, sus propiedades biológicas aún no han sido investigadas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante y el efecto protector del extracto acetónico de hojas de *Ficus crocata* (EAFC) sobre la lipoperoxidación y la citotoxicidad inducida por H₂O₂ en células HaCaT. La actividad antioxidante del EAFC se determinó con las técnicas de DPPH y ABTS, el efecto protector sobre la lipoperoxidación y citotoxicidad inducidas por H₂O₂ se evaluaron con la técnica 1-metil-2-fenilindol (MPI) y por ensayos de viabilidad celular (MTT), respectivamente. Los resultados muestran que el EAFC posee actividad antioxidante comparable al ácido ascórbico e incluso superior a este ($p < 0.05$), también tuvo un efecto protector sobre la lipoperoxidación y citotoxicidad al evitar el aumento de los niveles de malondialdehído (MDA) ($p < 0.0001$) y la disminución de la viabilidad celular ($p < 0.001$). Los resultados, sugieren que *Ficus crocata* posee actividad antioxidante y citoprotectora contra el daño oxidativo producido por H₂O₂, por lo que probablemente podría tener beneficios para la salud y utilizarse a largo plazo para la fabricación de suplementos nutricionales o farmacéuticos.

Palabras clave: *Ficus crocata*, DPPH, ABTS, MDA, H₂O₂, antioxidante.

1. Introducción

El estrés oxidativo (EOx) es un desequilibrio bioquímico generado por la alta producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la baja capacidad antioxidante de las células [1]. Las EROs como el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se producen constantemente como un subproducto del metabolismo celular normal y tienen un papel importante en la señalización y la homeostasis celular [2], sin embargo, existen factores externos como la inflamación y la exposición a radiación ionizante y UV [3, 4] que incrementan las concentraciones celulares de EROs. Estas especies pueden reaccionar con DNA, proteínas y lípidos generando alteraciones en su estructura y función, lo que se conoce como daño oxidativo [5]; comprometiendo el metabolismo, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular [6].

Para evitar el daño oxidativo, las células disponen de sistemas antioxidantes [7], sin embargo, durante el desequilibrio redox estos suelen ser insuficientes para mantener los niveles de EROs por debajo del umbral de riesgo, por lo que también requieren de antioxidantes exógenos adquiribles naturalmente de alimentos o plantas [1]. En los últimos años, la investigación sobre las propiedades antioxidantes en plantas ha aumentado considerablemente, así como su aplicación en productos farmacéuticos y suplementos nutricionales, por lo tanto, la caracterización químico-biológica de los componentes de algunas plantas con propiedades medicinales, es esencial en la búsqueda de nuevas alternativas antioxidantes [8, 9].

Estudios farmacológicos han mostrado que los extractos acuosos, metanólicos, etanólicos, clorofórmicos, de éter de petróleo y de acetato de etilo, obtenidos de hojas, corteza o fruto de varias especies del género *Ficus* (Moraceae) [9-19], poseen actividad antiobesogénica y antidiabética *in vitro* [10], regulan la actividad y la concentración de los antioxidantes endógenos SOD, GPx, CAT y GSH [11, 12], disminuyen los niveles de malondialdehído (MDA) [13, 14], tienen actividad protectora sobre la cardiomiopatía y nefropatía en ratas diabéticas [15] y antihipertensiva en ratas hipertensas [16], así mismo, disminuyen la expresión de factores asociados al proceso inflamatorio y al EOx en células HaCaT [17]. Los efectos biológicos de *Ficus* se han relacionado con la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios presentes en los extractos, entre ellos terpenos, fitoesteroles, vitaminas, compuestos fenólicos y flavonoides [9-19]. A pesar de los antecedentes que hay sobre la actividad antioxidante del género *Ficus*, muchas especies permanecen pobremente estudiadas [9], tal es el caso de *Ficus crocata*, una de las especies de mayor distribución en México [20] usada en infusiones (corteza y hojas) como medicina tradicional para el control

de algunas enfermedades, sin embargo, esta especie no cuenta con estudios fitoquímicos o farmacológicos que avalen su efecto antioxidante y protector sobre el daño oxidativo, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antioxidante y el efecto protector del extracto acetónico de hojas de *F. crocata* sobre el daño oxidativo y citotóxico inducido por H₂O₂ en células no tumorales HaCaT. Estos datos aportarán información sobre la actividad biológica de esta especie para fomentar su aplicación como una posible alternativa de uso en la industria farmacéutica.

2. Métodos

2.1. Reactivos

2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (Sigma-Aldrich[®], USA), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (ABTS) (Sigma-Aldrich[®], USA), persulfato de potasio, HCl, Medio Eagle modificado por Dulbecco formula 12 (DMEM/F-12) (Gibco[®] Life Technologies, USA), Suero Fetal Bovino (SFB) (By productos S.A. de C.V, México), penicilina/estreptomicina, dimetil sulfóxido (DMSO), Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Merck Millipore, Germany), H₂O₂ (Sigma-Aldrich[®], USA), acetonitrilo, metanol y 1-metil-2-fenilindol (MPI) (Sigma-Aldrich[®], USA).

2.2. Obtención del extracto

Las hojas de *F. crocata* fueron recolectadas en Las Petaquillas, Guerrero, México, en noviembre del 2015. La planta fue identificada por la M. C. Blanca Verónica Juárez Jaime y el Biol. Mauricio Mora Jarvio del Herbario Nacional de México (MEXU). Se depositó una muestra en el instituto MEXU (2052).

Para la obtención del extracto acetónico de hojas de *F. crocata* (EAFC) se molieron 100 g de hojas secas y se maceraron con acetona (24 h, 3 veces), el material se filtró y la fase orgánica fue evaporada con un evaporador rotatorio a 60 °C y 80 rpm [21].

2.3. Ensayo de actividad antioxidante

2.3.1. Ensayo de inhibición del radical libre DPPH

En una placa de 96 pozos se hicieron diluciones seriadas del EAFC (0.2-200 µg/mL) y se añadieron 150 µL de la solución del DPPH^{*} (0.3 mM), para el blanco se usó metanol. Después de 30 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 545 nm en un lector de microplacas (Star Fax 2100, Awareness Technologies). El porcentaje de inhibición del DPPH^{*} fue determinado por la fórmula: % de inhibición = $[1 - (A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})] \times 100$. Como antioxidante estándar se utilizó ácido ascórbico [22].

2.3.2. Ensayo de inhibición del radical ABTS

Se preparó un stock de ABTS disolviendo el reactivo en agua (7 mM). El ABTS^{•+} fue producido por la reacción del stock con persulfato de potasio [2.45 mM]; la mezcla fue incubada en oscuridad a temperatura ambiente por 16 h antes de su uso; se tomó 1 mL de esta solución y se diluyó con 60 mL de metanol. En una placa de 96 pozos se hicieron diluciones seriadas del EAFC (0.05-200 µg/mL) y se añadieron 150 µL de la solución del ABTS^{•+}. Para el blanco se usó metanol. Después de 30 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, se leyó la absorbancia a 734 nm. El porcentaje de inhibición del ABTS^{•+} fue determinado por la fórmula: % de inhibición = $[1 - (A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})] \times 100$. Como antioxidante estándar se utilizó ácido ascórbico [23].

Por medio de una regresión lineal se determinó la concentración inhibitoria (IC₅₀) de ambos radicales.

2.4. Efecto protector del EAFC sobre el daño inducido por H₂O₂ en células HaCaT

2.4.1. Cultivo celular

Se cultivaron queratinocitos humanos HaCaT en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% a 37°C y 5% de CO₂, hasta alcanzar un 80% de confluencia. Una vez alcanzada la confluencia las células se sembraron en placas para los tratamientos correspondientes. Los tratamientos se aplicaron en medio DMEM/F-12 al 1% de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina bajo las mismas condiciones de incubación.

2.4.2. Efecto del EAFC y del H₂O₂ sobre la viabilidad celular (MTT)

Para determinar las concentraciones citotóxicas del EAFC y del H₂O₂ se sembraron 1x10⁴ células/mL en una placa de cultivo celular de 96 pozos y se cultivaron durante 24 h. Posteriormente fueron tratadas con concentraciones seriadas del EAFC (1.25-320 µg/mL) por 24 h o H₂O₂ (200-1000 µM) durante 0.5, 1, 2 y 4 h. Se desechó el medio de cultivo y se agregaron 100 µL (5 mg/mL) de solución de MTT, se incubó durante 4 h y se añadió isopropanol (0.04 N) para disolver el precipitado. La densidad óptica (DO) se midió a 570 nm y las tasas de supervivencia se calcularon con la siguiente fórmula: % = $(DO_{\text{grupo tratado}} / DO_{\text{control}}) \times 100$ [24].

2.4.3. Efecto protector del EAFC sobre la citotoxicidad inducida por H₂O₂ (MTT)

Una vez definidas las concentraciones no citotóxicas del EAFC y las condiciones de tratamiento (concentración y tiempo de exposición) con H₂O₂ que indujeron una mayor citotoxicidad, se evaluó el efecto protector del pretratamiento con EAFC siguiendo las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Brevemente, se sembraron 1x10⁴

células/mL en una placa de cultivo celular de 96 pozos, se cultivaron durante 24 h y posteriormente se agregó el EAFC (0, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL) por 24 h. Después se eliminó el medio y se agregó medio fresco con H₂O₂ (1000 µM) durante 2 h. Una vez cumplido el tiempo de tratamiento, se desechó el medio y se agregaron 100 µL de solución de MTT, se incubó durante 4 h y se añadió isopropanol para disolver el precipitado. Se leyó la DO y se calculó el % de células viables con la misma fórmula del apartado anterior.

2.4.4. Inducción de lipoperoxidación con H₂O₂

Para determinar el efecto protector del EAFC contra la lipoperoxidación inducida por H₂O₂, inicialmente se eligieron las concentraciones y el tiempo de exposición al H₂O₂ que indujeran esta condición, se sembraron células en placas de 6 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%, se eliminó el medio y se aplicó H₂O₂ (0, 200, 400, 600, 800 y 1000 µM) durante 0.5, 1, 2 y 4 h. Se desechó el medio, se recuperó el sobrenadante y las células se tripsinizaron y resuspendieron en 65 µL de PBS (pH 7.4), se homogeneizaron en vórtex durante 1 min. Se mezclaron 50 µL de muestra (sobrenadante o células, individualmente) y 50 µL de agua Milli Q, 350 µL de reactivo MPI [10 mM] y 100 µL de HCl [37%], se agitaron y se incubaron durante 40 min a 45°C, se centrifugaron a 4°C a 7000 rpm durante 10 min, se tomó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 586 nm (NanoDrop 2000) [25]. Los datos de cada muestra se normalizaron con la concentración de proteína total obtenida por el ensayo de Bradford (se colocaron en un tubo Eppendorf 40 µL de agua Milli Q, 10 µL de muestra y 450 µL del reactivo de Bradford y se leyó a 595 nm). La concentración de MDA se calculó con la siguiente fórmula: % = (MDA _{grupo tratado} / Proteína total _{grupo tratado}) / (MDA _{control} / Proteína total _{control}) x 100.

2.4.5. Efecto protector del EAFC sobre la lipoperoxidación inducida por H₂O₂

Una vez definidas las condiciones (concentración y tiempo de exposición) para inducir la lipoperoxidación con H₂O₂, se evaluó el efecto protector del pre-tratamiento con EAFC siguiendo las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Brevemente, se sembraron células en placas de 6 pozos hasta alcanzar una confluencia del 80%, posteriormente, se aplicaron los tratamientos con el EAFC (1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL) por 24 h, se eliminó el medio y se aplicó H₂O₂ (1000 µM) por 2 h. Se recuperó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 65 µL de PBS, se homogeneizaron en vórtex por 1 min. Se mezclaron 50 µL de muestra y 50 µL de agua Milli Q, 350 µL de reactivo MPI y 100 µL de HCl, se agitaron y se incubaron por 40 min a 45°C, se centrifugaron a 4°C a 7000 rpm durante 10 min y se leyó la absorbancia a 586 nm [25]. Los datos se normalizaron con la concentración de

proteína total obtenida por el ensayo de Bradford y se calculó la concentración de MDA con la misma fórmula del apartado anterior.

2.5. Análisis de datos

Se utilizó el software GraphPad Prism 6.0 para la captura y el análisis de datos. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Se realizaron comparaciones múltiples de grupos utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett; los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3. Resultados y discusión

3.1. Actividad antioxidante

El EAFC inhibió el DPPH \cdot (Fig. 1A) y el ABTS $^{+\cdot}$ (Fig. 1B) de manera dependiente a la concentración hasta los 6.2 $\mu\text{g/mL}$ y 3.1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, después de estas últimas concentraciones el porcentaje de inhibición se mantuvo en más del 40% para DPPH \cdot y 70% para ABTS $^{+\cdot}$. El EAFC presentó una actividad de inhibición del ABTS $^{+\cdot}$ mayor al ácido ascórbico usado como estándar (IC_{50} del EAFC = $1.47 \pm 1.21 \mu\text{g/mL}$, IC_{50} del AA = $2.22 \pm 0.80 \mu\text{g/mL}$) ($p < 0.05$) (Fig. 1B), mientras que en el DPPH \cdot la actividad de inhibición del EAFC y del AA fueron iguales (IC_{50} del EAFC = $175.0 \pm 2.99 \mu\text{g/mL}$, IC_{50} del AA = $167.9 \pm 1.16 \mu\text{g/mL}$) ($p > 0.05$) (Fig. 1A).

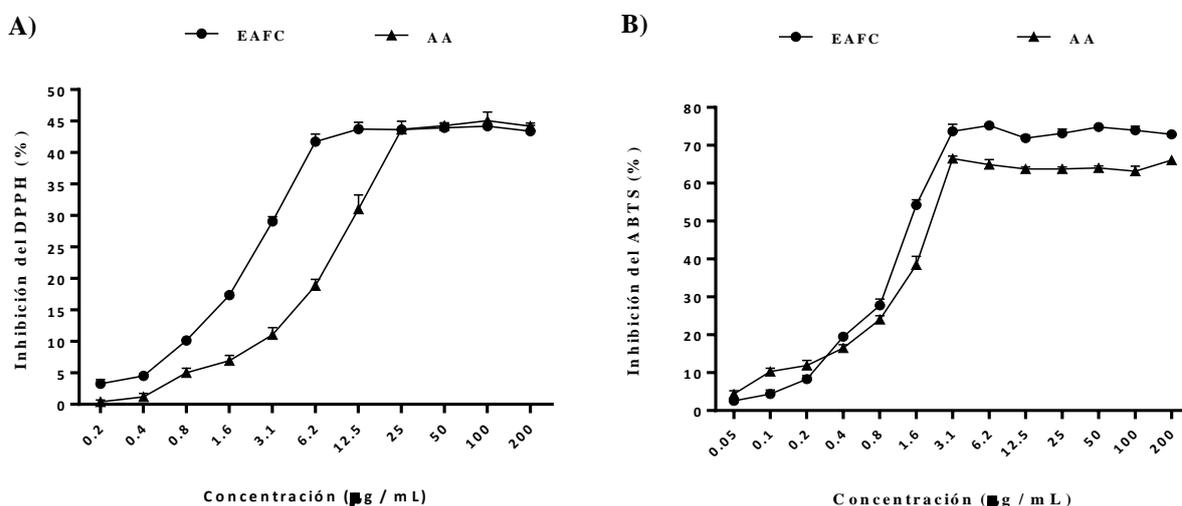


Fig. 1 Actividad de inhibición de los radicales libres DPPH (A) y ABTS (B) por el extracto acetónico de hojas de *F. crocata* (EAFC) y AA (ácido ascórbico).

Como se observa en la Fig. 1 el EAFC tuvo una mayor actividad de inhibición sobre el ABTS $^{+\cdot}$ en comparación con el DPPH \cdot , esto puede deberse a que el ABTS $^{+\cdot}$ reacciona energéticamente con los electrones y tiene una menor selectividad en la reacción con donantes de átomos de hidrógeno, por el contrario, el DPPH \cdot es más selectivo que el ABTS $^{+\cdot}$

en la reacción con donantes de hidrógeno y no reacciona con ácidos aromáticos que contienen solo un grupo hidroxilo [26]. Lo que demuestra que la actividad antioxidante del EAFC se debe a la presencia de metabolitos secundarios con un papel directo en la donación tanto de átomos de hidrógeno como de electrones. Recientemente se identificaron los compuestos del EAFC; los de mayor abundancia son los tocoferoles, seguido de triterpenos, esteroides y diterpenos (Anexo 1) [27]. Todos ellos han sido reconocidos como antioxidantes por su acción directa en la captación de radicales libres [28-34], por lo que su acción sinérgica podría ser la responsable de la actividad antioxidante del EAFC encontrada en este estudio. La inhibición del DPPH[•] y del ABTS^{•+} demuestra la capacidad que tiene el EAFC de reducir diferentes radicales en varios sistemas, lo que indica que puede ser un agente terapéutico útil para prevenir o tratar el daño patológico relacionado con el EOX [28].

3.2. Efecto del EAFC sobre la viabilidad celular

Para determinar el efecto protector del EAFC contra la lipoperoxidación y la citotoxicidad inducida por H₂O₂ en células HaCaT, inicialmente se determinaron las concentraciones del EAFC que no presentaran citotoxicidad en la línea celular. No se observaron cambios en la viabilidad celular en las concentraciones de 1.25-20 µg/mL del EAFC, mientras que en concentraciones de 40-320 µg/mL el EAFC presentó efectos citotóxicos, disminuyendo un 16.75% la viabilidad celular ($p < 0.0001$) (Fig. 2), por lo que se usaron las concentraciones de 1.25-20 µg/mL del EAFC como pretratamiento en los ensayos posteriores.

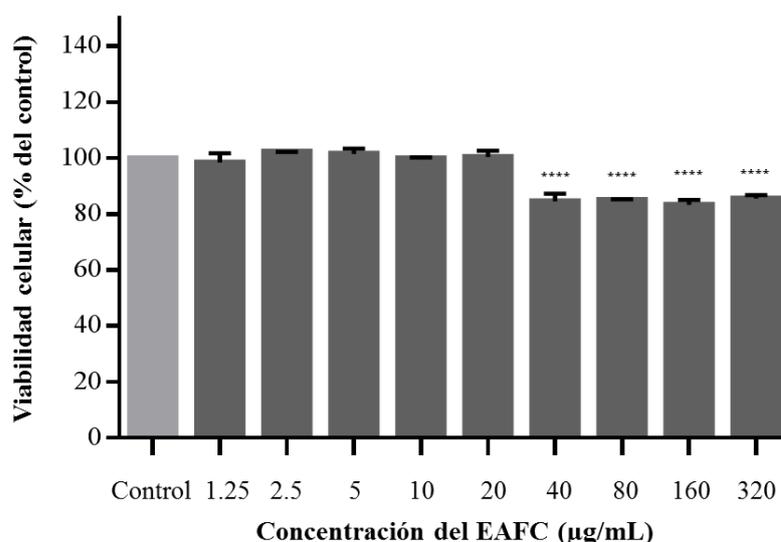


Fig. 2 Efecto del EAFC sobre la viabilidad celular. Las células HaCaT se trataron con diferentes concentraciones (1.25-320 µg/mL) de EAFC durante 24 h. Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y se examinaron con un análisis de ANOVA seguido de una prueba de Dunnett respecto al control. **** $p < 0.0001$.

3.3. Establecimiento del modelo de daño oxidativo inducido por H₂O₂

Con la finalidad de conocer el efecto protector del EAFC sobre el daño oxidativo y la viabilidad celular, se desarrolló un modelo experimental de lipoperoxidación y citotoxicidad a partir del tratamiento con H₂O₂ en diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Los resultados en la Fig. 3 muestran una mayor lipoperoxidación y citotoxicidad con una concentración de 1000 µM de H₂O₂ durante 2 h, bajo estas condiciones los niveles de MDA incrementaron significativamente respecto al control ($p < 0.0001$) (Fig. 3A) y la viabilidad celular se redujo a un 69.1% ($p < 0.0001$) (Fig. 3B), de igual manera se observaron alteraciones morfológicas en las células (Fig. 3C), por lo que se eligió esta condición de tratamiento para el modelo de daño celular.

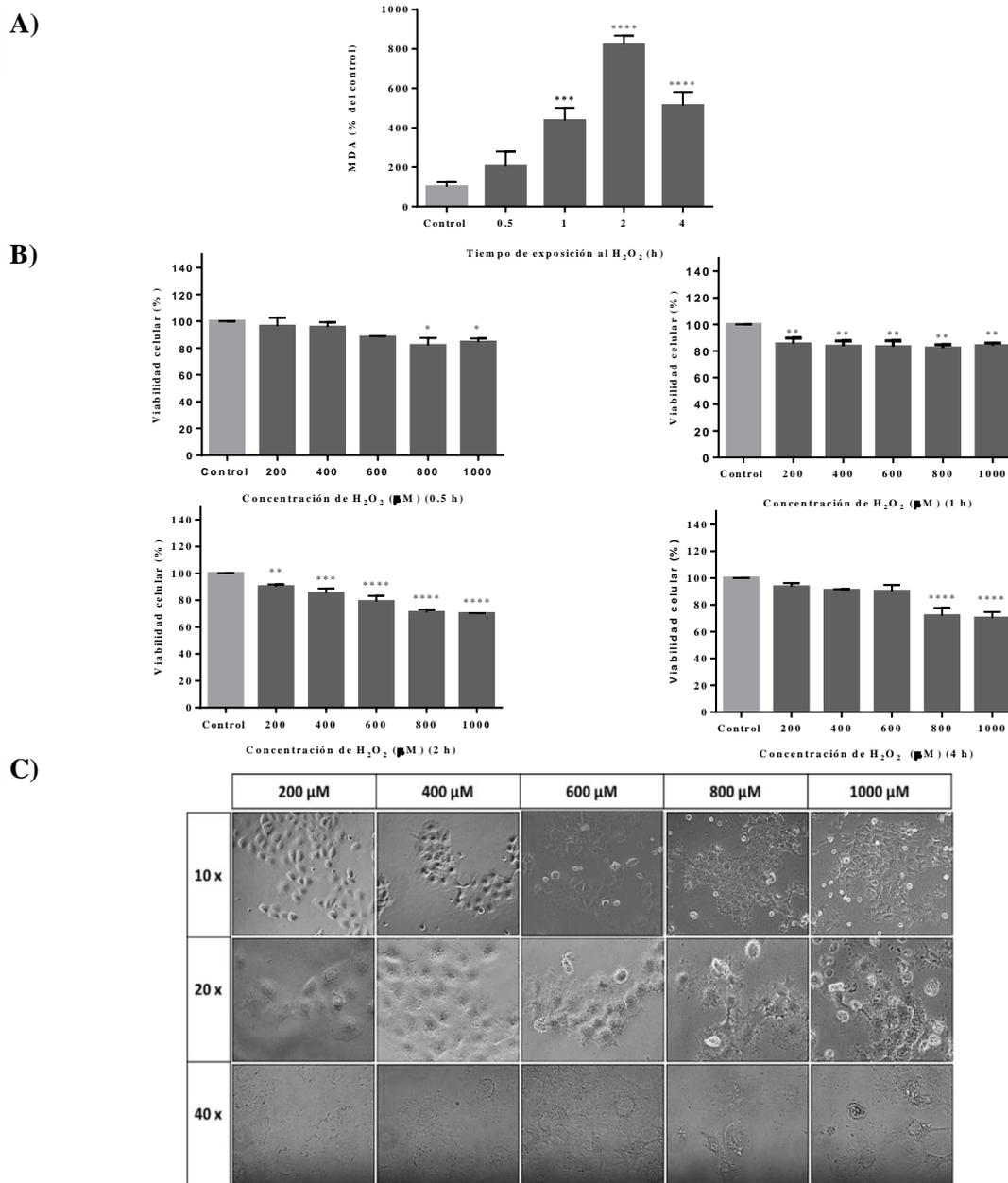


Fig. 3. Establecimiento del daño oxidativo inducido por H₂O₂. **A) Peroxidación lipídica inducida por H₂O₂.** Las células HaCaT se trataron con 1000 µM de H₂O₂ por 0.5, 1, 2 y 4 h. **B) Ensayo de citotoxicidad del H₂O₂.** Las células HaCaT se trataron con H₂O₂ (200 µM-1000 µM) durante 0.5, 1, 2 y 4 h. Los datos se expresaron como media ± desviación estándar de tres experimentos independientes y se examinaron con un análisis de ANOVA, seguido de una prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ es significativamente diferente del control. **C) Micrografías de las células HaCaT.** Las células se trataron con H₂O₂ (200-1000 µM) durante 2 h (microscopio Evos).

Probablemente dentro de la célula el H₂O₂ se convirtió en radicales OH[•] en presencia de Fe²⁺ a partir de la reacción de Fenton [35, 36] y alteró macromoléculas intracelulares, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas ya que son los principales blancos de EROs, provocando como evento temprano la peroxidación lipídica [37]. Esto explica la inducción de la lipoperoxidación a un tiempo corto de exposición con H₂O₂ (2 h) observado en la Fig. 3A. Además de provocar lipoperoxidación, las altas

concentraciones de EROs pueden dañar otras macromoléculas como DNA y proteínas, acelerando el daño oxidativo en los organelos y la muerte celular [5, 38]. El efecto citotóxico del H₂O₂ sobre las células HaCaT en la mayoría de los tratamientos (Fig. 3B) fue similar a los efectos reportados previamente, coincidiendo con la reducción en la viabilidad celular dependiente de la concentración de H₂O₂ [35, 38-40]. Considerando que la homeostasis mitocondrial juega un papel clave sobre la viabilidad y supervivencia celular [41], el efecto citotóxico se ha asociado a la disfunción mitocondrial y los eventos apoptóticos producidos por el H₂O₂ [35, 38-40]. Las mitocondrias que funcionan correctamente producen ATP y modulan el equilibrio redox celular para asegurar el metabolismo de las células epidérmicas [42, 43], sin embargo, las mitocondrias dañadas participan en la activación y amplificación de la señal apoptótica a través de múltiples efectos [44]. Recientemente se ha reportado que la lesión oxidativa severa inducida por H₂O₂ en células HaCaT, induce disfunción mitocondrial al incrementar las concentraciones de EROs, disminuir las defensas antioxidantes (SOD, GPx y GSH) e incrementar la liberación de citocromo c al citoplasma y al núcleo, además provoca el colapso del metabolismo energético mitocondrial reduciendo la captación de glucosa, disipando el potencial de membrana, disminuyendo la expresión del complejo respiratorio mitocondrial, la producción de ATP y la formación de ácido láctico [39]. Con todos estos eventos el H₂O₂ promueve la apoptosis, debido a que incrementa el número de células muertas, la reducción en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la sobreexpresión y activación de proteínas pro-apoptóticas Bax y las caspasas 3, 6, 7, 8 y 9 [35, 39, 40]. Estos resultados se han relacionado con el incremento de la expresión y fosforilación de p38 y JNK pertenecientes a la vía MAPK [40], la principal vía de señalización inductora de la apoptosis en respuesta al EOX [45, 46, 47]. La exposición al H₂O₂ en células HaCaT también incrementa de manera dependiente a la concentración, la expresión de la formina-2 invertida (INF2), un regulador dinámico mitocondrial asociado a lesión por isquemia reperusión [39]. INF2 es una proteína que interactúa con actina y el retículo endoplásmico (RE). La sobreexpresión de INF2 induce la formación excesiva de fibras de actina alrededor del RE, provocando un desequilibrio en las concentraciones de calcio citosólico [48]. El exceso de calcio citosólico provoca EOX, la disminución de Bcl-2 y el aumento de Bax, generando el colapso del potencial de la membrana mitocondrial, la liberación del citocromo c, la activación de caspasas y el desencadenamiento de la apoptosis [49]. INF2 también activa la fisión mitocondrial al reprimir al factor inducido por hipoxia 1 (HIF1), lo que evita que HIF1 promueva la expresión de la proteína de atrofia óptica de tipo 1 (OPA1) [39]. OPA1 es una proteína estructural que evita la fragmentación

y promueve la fusión mitocondrial, por lo tanto la represión de esta vía altera la función mitocondrial y el metabolismo celular [50]. Todas estas alteraciones pudieron haber sido provocadas por el H₂O₂ en las células HaCaT en este estudio y pudieron haber ocasionado el efecto citotóxico observado en la Fig. 3B y 3C.

3.4. Efecto protector del EAFC sobre la peroxidación lipídica

El pretratamiento con el EAFC evitó la lipoperoxidación en todas las concentraciones evaluadas en comparación con las células tratadas únicamente con H₂O₂ ($p < 0.0001$). De manera específica, el EAFC redujo la formación de MDA un 9.9 (1.25 µg/mL), 7.3 (2.5 µg/mL), 15.2 (5 µg/mL), 25.1 (10 µg/mL) y 143.5 (20 µg/mL) veces respecto al grupo tratado con H₂O₂, el cual aumentó la formación de MDA 8.2 veces más respecto al control ($p < 0.0001$). A pesar de que el pretratamiento con el EAFC no mostró diferencias con el control, en la mayoría de las concentraciones tuvo una tendencia a disminuir la formación de MDA por debajo de éste último grupo, sobre todo en las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL en donde se observa una disminución dependiente al incremento de la concentración del EAFC ($p > 0.05$) (Fig. 4).

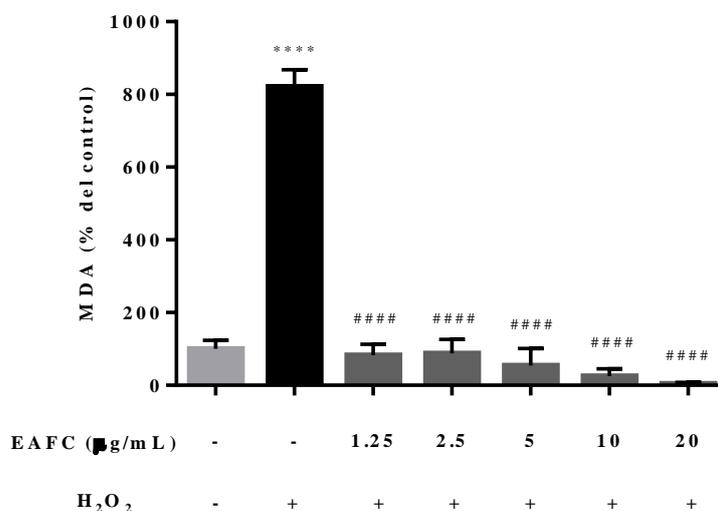


Fig. 4. Efecto protector del EAFC sobre la peroxidación lipídica inducida por H₂O₂. Las células HaCaT fueron pretratadas con el EAFC (1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL) durante 24 h antes del tratamiento con H₂O₂ (1000 µM por 2 h). Los resultados se expresaron respecto al porcentaje de células tratadas sólo con H₂O₂ (#### $p < 0.0001$) y respecto a las células control (**** $p < 0.0001$). Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y se examinaron con un análisis de ANOVA, seguido de una prueba de Dunnett.

El efecto protector sobre la lipoperoxidación también ha sido reportado en el extracto hidrometanólico de la corteza *F. sycomorus* [51] y el extracto acuoso de hojas de *F. exasperata* [52], los extractos redujeron los nivel de MDA *in vivo* en cerebro e *in vitro* en corazón de ratas expuestas a inductores de EOX. Este efecto se ha asociado a la actividad

antioxidante de los extractos, atribuida a los compuestos fenólicos hallados en los mismos, debido a que se observó actividad de inhibición de radicales libres, un incremento en la concentración de antioxidantes endógenos y quelación de Fe^{2+} de una manera dosis-dependiente [51, 52]. Los metabolitos secundarios aislados en el EAFC son compuestos fenólicos y algunos son precursores de estos, también han sido reconocidos como antioxidantes por su acción directa en la captación de radicales libres, por lo que regulan su concentración en el medio, previniendo alteraciones morfológicas y el daño oxidativo causado por inductores de EOX [28-34]. Probablemente la actividad citoprotectora sobre la lipoperoxidación de estos compuestos al igual que en los extractos de *F. sycomorus* [51] y *F. exasperata* [52], también se debe a la formación de complejos entre los compuestos fenólicos con Fe^{2+} evitando así su participación en las reacciones de transferencia de electrones, que causan la generación del radical OH^{\bullet} y la etapa inicial de la peroxidación lipídica [53], ya que se ha demostrado que los diterpenos [29] y los triterpenos [31] disminuyen la producción de OH^{\bullet} . Adicionalmente se ha demostrado que los triterpenos tienen un poder reductor equivalente al glutatión (GSH), un agente citoprotector reconocido [31] y poseen una fuerte actividad de captación contra el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y sus metabolitos [32]. Mientras tanto, los esteroides y tocoferoles [33] reducen el H_2O_2 por donación de un átomo de hidrógeno [28], lo que demuestra la alta capacidad antioxidante de estos compuestos en la prevención de la formación y la reducción de radicales libres.

El pretratamiento con EAFC por su efecto directo sobre EROs probablemente también reguló las concentraciones y actividad de los antioxidantes endógenos, ya que se ha reportado que los tocoferoles, triterpenos, diterpenos y esteroides regulan la concentración proteica y actividad de GSH, GPx, GR, SOD y CAT [34, 54-56].

Los tocoferoles son los compuestos mayoritarios en el EAFC, debido a que son antioxidantes importantes en la protección de las células, la presencia de estos pudo haber influido en la disminución del EOX y de esta manera evitar la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares [57, 58]. La actividad de los tocoferoles se ha atribuido a su naturaleza lipofílica que facilita su distribución libre y acción en la membrana, favoreciendo la eliminación de los lipoperóxidos, evitando la formación de MDA [59, 60], los diterpenos, triterpenos y esteroides también tienen un efecto protector sobre la peroxidación lipídica al reducir los niveles de MDA [5, 29, 34, 54, 55]. De esta manera los compuestos del EAFC pudieron haber protegido a la célula frente al daño oxidativo producido por el H_2O_2 , lo que coincide con el efecto observado en la Fig. 4, en donde se puede ver que el pretratamiento con el EAFC evitó la formación de MDA inducida por el

H₂O₂ ($p < 0.0001$), esto también concuerda con las imágenes de la figura 5B, en donde se observa que el EAFC evita el daño producido por el H₂O₂ sobre la membrana y la morfología celular, lo que puede estar directamente relacionado con la prevención de la lipoperoxidación.

3.5. Efecto protector del EAFC contra la citotoxicidad

El EAFC también tuvo un efecto protector contra la citotoxicidad inducida por H₂O₂. De forma específica, la exposición previa al EAFC mantuvo la viabilidad celular en un 94.9% (1.25 µg/mL), 93.7% (2.5 µg/mL), 94.9% (5 µg/mL), 92.7% (10 µg/mL) ($p < 0.0001$) y 83.1% (20 µg/mL) ($p < 0.001$), en comparación con el grupo expuesto al H₂O₂ (69.1% respecto al control) (Fig. 5A), además previno las alteraciones morfológicas causadas por este compuesto (Fig. 5B).

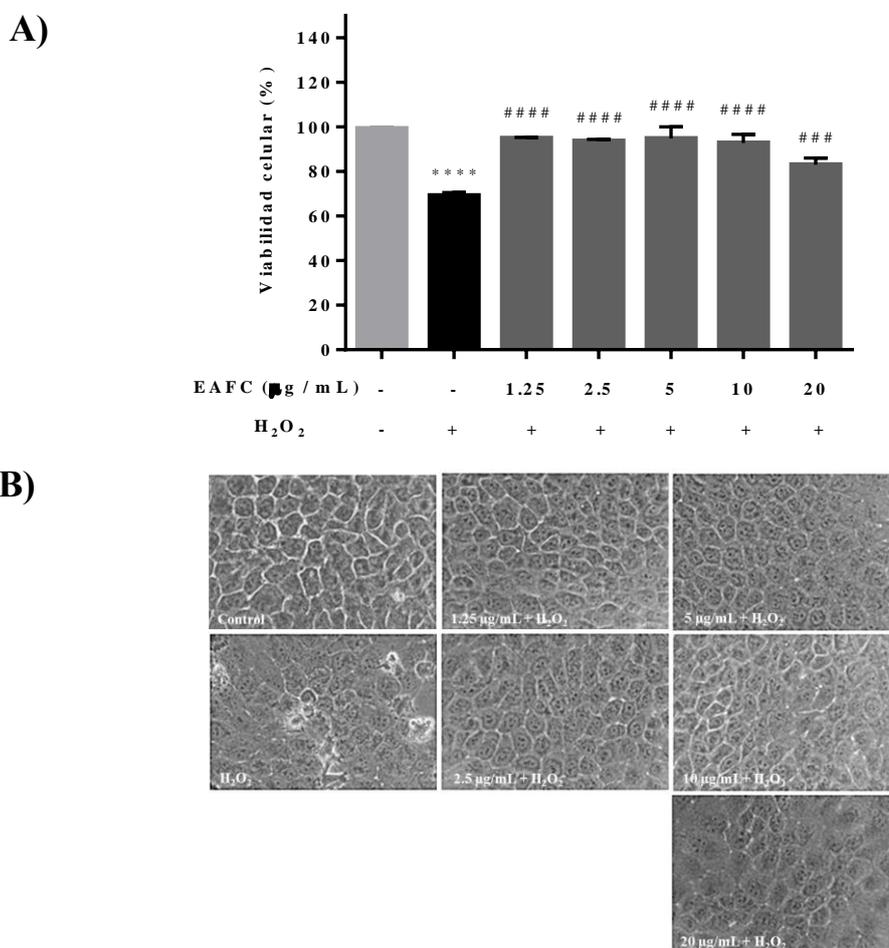


Fig. 5 Efecto protector del EAFC sobre la citotoxicidad inducida por H₂O₂. A) Efecto protector del EAFC sobre la viabilidad celular. Las células HaCaT fueron pretratadas con el EAFC (1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL) durante 24 h antes del tratamiento con H₂O₂ (1000 µM por 2 h). Los resultados se expresaron respecto al porcentaje de células tratadas sólo con H₂O₂ (### $p < 0.001$) (#### $p < 0.0001$) y las células control (**** $p < 0.0001$). Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y se examinaron con un análisis de ANOVA, seguido de una prueba de Dunnett. **B) Micrografías de las células HaCaT.** Las células se pretrataron con EAFC (1.25, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL) por 24 h antes del tratamiento con H₂O₂ (1000 µM por 2 h) (microscopio Evos).

Los resultados de la Fig. 5 coinciden con varios reportes en los que se ha señalado la actividad protectora de otras especies de *Ficus* sobre las alteraciones celulares y tisulares causadas por inductores de daño oxidativo en modelos *in vivo*. El extracto acuoso del fruto de *F. carica* L. tiene un efecto citoprotector en cardiomiocitos sobre la citotoxicidad de un inductor de EOX, el efecto protector se ha relacionado con la prevención de la formación de EROs, la peroxidación lipídica, la disfunción mitocondrial, el colapso del potencial de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c. También se ha relacionado con el aumento de los niveles GSH y la actividad de la succinato deshidrogenasa [61]. Los extractos acuosos y etanólicos de corteza de *F. racemosa* linn tienen actividad neuroprotectora en ratas diabéticas al aumentar las concentraciones de SOD y CAT, reducir el EOX, la inflamación temprana y la peroxidación lipídica [62]. El extracto etanólico de la corteza de *F. racemosa* tiene un efecto protector sobre la hipertrofia cardíaca y las alteraciones morfológicas renales en ratas diabéticas, la actividad protectora se ha asociado a la disminución de la peroxidación lipídica (MDA) y al incremento de la actividad de SOD y GSH, los resultados fueron atribuidos a las altas concentraciones de triterpenos hallados en el extracto [15]. Los antecedentes anteriores sugieren que el efecto citoprotector del EAFC sobre el H₂O₂ observado en la Fig. 5, podría estar relacionado con la prevención del EOX, la lipoperoxidación y la disfunción mitocondrial por parte de los compuestos presentes en el EAFC; los triterpenos son uno de ellos y al igual que en *Ficus racemosa* [15] probablemente también fueron parte de los metabolitos secundarios responsables de la actividad citoprotectora frente al H₂O₂ (Fig. 5). Además de los triterpenos, el resto de los compuestos presentes en el EAFC también han demostrado tener actividad citoprotectora ante la toxicidad de algunos inductores de EOX. Se ha reportado que los tocoferoles, los triterpenos y los esteroides tienen actividad neuroprotectora [30, 34, 63], hepatoprotectora [5, 55], cardioprotectora [64] y citoprotectora sobre el esperma [65] y las alteraciones morfológicas testiculares [54] en ratas y ratones. Específicamente, se ha indicado que los tocoferoles reducen los niveles de EROs y p53 en células HaCaT expuestas a luz UV y con ello aumentan la viabilidad celular alterada por este inductor de EOX [66]. En otros estudios se ha señalado que los tocoferoles aumentan la tasa de supervivencia en células de epitelio renal expuestas a EOX, ya que evita la despolarización de la membrana mitocondrial por medio de la disminución de los niveles de H₂O₂, disminuyendo también los niveles de caspasa-3 [33, 67, 68]. Los triterpenos además de prevenir la lipoperoxidación, previenen la carbonilación de proteínas y protegen la permeabilidad de la membrana mitocondrial al evitar la disminución de Bcl-2 y el aumento de Bax, importantes reguladores de la cascada apoptótica.

También disminuyen la liberación del citocromo c y el nivel de las caspasas 9/3 e inhiben el daño al DNA al reducir la formación de 8-OH-dG y la fragmentación del DNA [5, 55, 69, 70].

En conjunto, el efecto citoprotector del EAFC sobre el daño oxidativo y la citotoxicidad en el modelo biológico, probablemente se deba al papel sinérgico de los compuestos del EAFC, ya que se ha demostrado que además de actuar como reductores directos de EROs, regular la concentración y actividad de los antioxidantes endógenos, también mantienen los tocoferoles en el medio al reducirlos y reciclarlos [71], potenciando de esta manera la protección sobre el daño oxidativo y la regulación de las vías que preservan la viabilidad celular. Por lo tanto, las hojas de *F. crocata* podrían tener beneficios para la salud, pudiéndose utilizar a largo plazo para la fabricación de suplementos nutricionales o farmacéuticos.

A pesar de que este estudio proporciona por primera vez información relevante sobre la riqueza antioxidante de *F. crocata* en un modelo celular, aún hace falta realizar investigaciones en otros modelos celulares y en modelos *in vivo* para reafirmar su actividad antioxidante.

4. Conclusiones

El extracto acetónico de hojas de *F. crocata* tiene actividad antioxidante comparable al ácido ascórbico, no afecta la viabilidad de las células no tumorales HaCaT y evita la lipoperoxidación y citotoxicidad inducida por H₂O₂ en esta misma línea celular.

5. Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Ana Elvira Zacapala Gómez, al M. C. Juan Miguel Mendoza Bello, al Dr. Marco Antonio Ramírez Vargas y al Dr. Eduardo Castañeda Saucedo por su apoyo técnico en el cultivo celular y la determinación de MDA.

Brenda de la Cruz Concepción recibió una beca por el Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CoNaCyT) [número de registro 829255].

7. Referencias

- [1] Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Res Int* 2014;2014:761264.
- [2] Chen X, Song M, Zhang B, Zhang Y. Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment. *Oxid Med Cell Longev*, 2016;2016:1580967.

- [3] Biswas SK. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016:5698931.
- [4] Zi Y, Zhang B, Jiang B, Yang X, Liang Z, Liu W, He C, Liu L. Antioxidant action and protective and reparative effects of lentinan on oxidative damage in HaCaT cells. *J Cosmetic Dermatol* 2018;17:1108-1114.
- [5] Kumari A, Kakkar P. Lupeol prevents acetaminophen-induced *in vivo* hepatotoxicity by altering the Bax/Bcl-2 and oxidative stress-mediated mitochondrial signaling cascade. *Life Sci* 2012;90:561-570.
- [6] Yamaguchi F, Tsuchiya M, Shimamoto S, Fujimoto T, Tokumitsu H, Tokuda M, Kobayashi R. Oxidative Stress Impairs the Stimulatory Effect of S100 Proteins on Protein Phosphatase 5 Activity. *Tohoku J Exp Med* 2016;240:67-78.
- [7] Hecht F, Pessoa CF, Gentile LB, Rosenthal D, Carvalho DP, Fortunato RS. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumour biology* 2016;37:4281-4291.
- [8] Kumar V, Shriram V, Bhagat R, Khare T, Kapse S, Kadoo N. Phytochemical profile, anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-proliferative activities of *Pogostemon deccanensis* essential oils. *3 Biotech* 2019;9:31.
- [9] Mouho DG, Oliveira AP, Kodio CG, Valentão P, Gil-izquierdo A, Andrade PB, Outtara ZA, Bekro YA, Ferreres F. Chemical findings and *in vitro* biological studies to uphold the use of *Ficus exasperata* Vahl leaf and stem bark. *Food Chem Toxicol* 2018;112:134-144.
- [10] Mopuri A, Ganjayi M, Meriga B, Koorbanally NA, Islam MS. The effects of *Ficus carica* on the activity of enzymes related to metabolic syndrome Ramgopal. *J Food Drug Anal* 2018;26:201-210.
- [11] Kirana H, Agarwal SS. Aqueous extract of *Ficus religiosa* Linn. Reduces oxidative stress in experimentally induced type 2 diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 2009;47:822-826.
- [12] Nurdiana S, Goh YM, Ahmad H, Dom SM, Syimal'ain N, Noor Mohamad Zin NS, Ebrahimi M. Changes in pancreatic histology, insulin secretion and oxidative status in diabetic rats following treatment with *Ficus deltoidea* and vitexin. *BMC Complement Altern Med* 2017;17:290.
- [13] Bhangale JO, Acharya SR. Anti-Parkinson Activity of Petroleum Ether Extract of *Ficus religiosa* (L.) Leaves. *Adv Pharmacol Sci* 2016;2016:9436106.
- [14] Zingue S, Foyet HS, Djiogue S, Ezo YE, Ngatanko H, Fachagbo P, Njamen D. Effects of *Ficus umbellata* (Moraceae) Aqueous Extract and 7-Methoxycoumarin on Scopolamine-Induced Spatial Memory Impairment in Ovariectomized Wistar Rats. *Behav Neurol* 2018;2018:5751864.
- [15] Joshi H, Vaishnav D, Sanghvi G, Rabadia S, Airao V, Sharma T. *Ficus recemosa* bark extract attenuates diabetic complications and oxidative stress in STZ-induced diabetic rats. *Pharm Biol* 2016;54:1586-1595.
- [16] Kamal MSA, Ismail NH, Satar NA, Azis NA, Radjeni Z, Mohammad Noor HS, Kasim N, Singh H. Standardized ethanol-water extract of *Ficus deltoidea Angustifolia* reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2019;16:1-8.
- [17] Turkoglu M, Pekmezci E, Kilic S, Dundar C, Sevinc H. Effect of *Ficus carica* leaf extract on the gene expression of selected factors in HaCaT cells. *J Cosmet Dermatol* 2017;16:1-5.
- [18] Eshwarappa RS, Iyer S, Subaramaiha SR, Richard SA, Dhananjaya BL. Antioxidant activities of *Ficus glomerata* (Moraceae) leaf gall extracts. *Pharmacognosy Res* 2015;7:114-120.
- [19] Sumi SA, Siraj MA, Hossain A, Mia MS, Afrin S, Rahman MM. Investigation of the Key Pharmacological Activities of *Ficus racemosa* and Analysis of Its Major Bioactive Polyphenols by HPLC-DAD. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016;2016:3874516.
- [20] Ibarra G, López L. Potential distribution of the genus *Ficus* (Moraceae) in Mexico. National Autonomous University of Mexico, Center for Ecosystem Research, Michoacán University of San Nicolás de Hidalgo. Final report SNIB-CONABIO, project JM037; 2015.
- [21] Sánchez-Valdeolivar CA. Caracterización fitoquímica y actividad antiproliferativa de extractos de hojas de *Ficus crocata* en la línea celular MDA-MB-231. Tesis de maestría en biociencias, Universidad Autónoma de Guerrero, México, 2018.
- [22] Sulaiman SF, Ooi KL. Polyphenolic and vitamin C contents and antioxidant activities of aqueous extracts from mature-green and ripe fruit fleshs of *Mangifera* spp. *J Agric Food Chem* 2012;60:11832–11838.
- [23] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 1999;26:1231-1237.
- [24] Merck. MTT Cell Growth Assay Kit. Available at https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/MTT-Cell-Growth-Assay-Kit,MM_NF-CT01. Accessed October 27, 2017.

- [25] Siddique YH, Ara G, Afzal M. Estimation of Lipid Peroxidation Induced by Hydrogen Peroxide in Cultured Human Lymphocytes. *Dose-Response* 2012;10:1-10.
- [26] Cerretani L, Bendini A. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. 1st ed. San Diego: Academic Press; 2010.
- [27] Cayetano-Salazar L, Acevedo-Quiroz ME. Los extractos de hoja de *Ficus crocata* disminuyen la migración e invasión inducida por leptina en células MDA-MB-231. Tesis de maestría en biociencias, Universidad Autónoma de Guerrero, México, 2019.
- [28] Adebisi OE, Funsho OO, Ning-Hua T, Guang-Zhi Z. *In vitro* antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of ethanol extract of stem and leaf of *Grewia carpinifolia*. *Beni-Suef Univ J Appl Sci* 2017;6:10-14.
- [29] Santos CC, Salvadori MS, Mota VG, Costa LM, de Almeida AA, de Oliveira GA, Costa JP, de Sousa DP, de Freitas RM, de Almeida RN. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol *In Vivo* and *In Vitro* Models. *Neurosci J* 2013;2013:949452.
- [30] Zerbos IA, Nikolaidis E, Lavrentiadou SN, Tsantarliotou MP, Eleftheriadou EK, Papanagioutou EP, Fletouris DJ, Georgiadis M, Taitzoglou IA. Endosulfan-induced lipid peroxidation in rat brain and its effect on t-PA and PAI-1: ameliorating effect of vitamins C and E. *J Toxicol Sci* 2011;36:423-433.
- [31] Das B, Yeager H, Baruchel H, Freedman MH, Koren G, Baruchel S. *In vitro* cytoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: Implications in cancer chemotherapy. *Eur J Cancer* 2003;39:2556–2565.
- [32] Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 2006;17:429-445.
- [33] Wu TK, Pan YR, Wang HF, Wei CW, Yu YL. Vitamin E (α -tocopherol) ameliorates aristolochic acid-induced renal tubular epithelial cell death by attenuating oxidative stress and caspase-3 activation. *Mol Med Rep* 2018;17:31-36.
- [34] Adebisi OE, Olayemi FO, Olopade JO, Tan NH. Beta-sitosterol enhances motor coordination, attenuates memory loss and demyelination in a vanadium-induced model of experimental neurotoxicity. *Pathophysiology* 2018;S0928-4680:30054-3
- [35] Sun Y, Zhou C, Huang S, Jiang C. Selenium Polysaccharide SPMP-2a from *Pleurotus geesteranus* Alleviates H₂O₂-Induced Oxidative Damage in HaCaT Cells. *Biomed Res Int* 2017;2017:4940384.
- [36] González-Burgos E, Liaudanskas M, Viškelis J, Žvikas V, Janulis V, Gómez-Serranillos MP. Antioxidant activity, neuroprotective properties and bioactive constituents analysis of varying polarity extracts from *Eucalyptus globulus* leaves. *J Food Drug Anal* 2018;26:1293-1302.
- [37] Xiao X, Liu J, Hu J, Zhu X, Yang H, Wang C, Zhang Y. Protective effects of protopine on hydrogen peroxide-induced oxidative injury of PC12 cells via Ca²⁺ antagonism and antioxidant mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2008;591:21–27.
- [38] Yoon JJ, Jeong JW, Choi EO, Kim MJ, Hwang-Bo H, Kim HJ, Hong SH, Park C, Lee DH, Choi YH. Protective Effects of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis in HaCaT human skin keratinocytes. *EXCLI J* 2017;16:426-438.
- [39] Chen Z, Wang C, Yu N, Si L, Zhu L, Zeng A, Liu Z, Wang X. INF2 regulates oxidative stress-induced apoptosis in epidermal HaCaT cells by modulating the HIF1 signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2019;111:151-161.
- [40] Yoon Y, Lee YM, Song S, Lee YY, Yeum KJ. Black soybeans protect human keratinocytes from oxidative stress-induced cell death. *Food Sci Nutr* 2018;6:2423-2430.
- [41] Fuhrmann DC, Brune B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia. *Redox Biol* 2017;12:208-215.
- [42] Zhou H, Shi C, Hu S, Zhu H, Ren J, Chen Y. BI1 is associated with microvascular protection in cardiac ischemia reperfusion injury via repressing Syk-Nox2-Drp1-mitochondrial fission pathways. *Angiogenesis* 2018a;21:599-615.
- [43] Zhou H, Wang J, Zhu P, Zhu H, Toan S, Hu S, Ren J, Chen Y. NR4A1 aggravates the cardiac microvascular ischemia reperfusion injury through suppressing FUNDC1-mediated mitophagy and promoting Mff-required mitochondrial fission by CK2 α . *Basic Res Cardiol* 2018b;113:23.
- [44] Zhu H, Jin Q, Li Y, Ma Q, Wang J, Li D, Zhou H, Chen Y. Melatonin protected cardiac microvascular endothelial cells against oxidative stress injury via suppression of IP3R-[Ca²⁺]_i/VDAC-[Ca²⁺]_m axis by activation of MAPK/ERK signaling pathway. *Cell Stress Chaperones* 2018;23:101-113.
- [45] Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett* 2014;344:174-179.

- [46] Miodovnik M, Koren R, Ziv E, Ravid A. The inflammatory response of keratinocytes and its modulation by vitamin D: The role of MAPK signaling pathways. *J Cell Physiol* 2012;227:2175-2183.
- [47] Xu P, Zhang M, Wang X, Yan Y, Chen Y, Wu W, Zhang L, Zhang L. Antioxidative Effect of Quetiapine on Acute Ultraviolet-B-Induced Skin and HaCaT Cell Damage. *Int J Mol Sci* 2018;19:1-13.
- [48] Lin S, Hoffmann K, Gao C, Petrulionis M, Herr I, Schemmer P. Melatonin promotes sorafenib-induced apoptosis through synergistic activation of JNK/c-jun pathway in human hepatocellular carcinoma. *J Pineal Res* 2017;62.
- [49] Zhou H, Zhu P, Guo J, Hu N, Wang S, Li D, Hu S, Ren J, Cao F, Chen Y. Ripk3 induces mitochondrial apoptosis via inhibition of FUNDC1 mitophagy in cardiac IR injury. *Redox Biol*, 2017;13:498-507.
- [50] Xu X, Zhang P, Kwak D, Fassett J, Yue W, Atzler D, Hu X, Liu X, Wang H, Lu Z, Guo H, Schwedhelm E, Böger RH, Chen P, Chen Y. Cardiomyocyte dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 (DDAH1) plays an important role in attenuating ventricular hypertrophy and dysfunction. *Basic Res Cardiol* 2017;112:55.
- [51] Foyet HS, Tchinda Deffo S, Koagne Yewo P, Antioch I, Zingue S, Asongalem EA, Kamtchoung P, Ciobica A. *Ficus sycomorus* extract reversed behavioral impairment and brain oxidative stress induced by unpredictable chronic mild stress in rats. *BMC Complement Altern Med* 2017;17:502.
- [52] Agunloye OM, Oboh G. Effect of Different Processing Methods on Antihypertensive Property and Antioxidant Activity of Sandpaper Leaf (*Ficus exasperata*) Extracts. *J Diet Suppl* 2018;15:871-883.
- [53] Oboh G, Rocha JBT. Antioxidant in foods: A new challenge for food processors: Leading edge antioxidants research. New York (NY): Nova Science Publishers Inc. 35-64.
- [54] Suriyakalaa U, Ramachandran R, Usha K, Sankarganesh D, Praveenkumar D, Abinaya S, Tirupathi Pichiah PB, Kamalakkannan S, Achiraman S. Squalene is a potential endocrine modulator in rat: A proof-of-principle study with 3-methylcholanthrene-induced toxicity. *Andrologia* 2018;50:e13117.
- [55] Kumari A, Kakkar P. Lupeol protects against acetaminophen-induced oxidative stress and cell death in rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol* 2012b;50:1781-1789.
- [56] Aljabr AM, Hussain A, Rizwan-ul-haq M. Toxin-Pathogen Synergy Reshaping Detoxification and Antioxidant Defense Mechanism of *Oligonychus afrasiaticus* (McGregor). *Molecules* 2018;23:1978.
- [57] Jamilian M, Hashemi Dizaji S, Bahmani F, Taghizadeh M, Memarzadeh MR, Karamali M, Akbari M, Asemi Z. A Randomized Controlled Clinical Trial Investigating the Effects of Omega-3 Fatty Acids and Vitamin E Co-Supplementation on Biomarkers of Oxidative Stress, Inflammation and Pregnancy Outcomes in Gestational Diabetes. *Can J Diabetes* 2017;41:143-149.
- [58] Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:7-30.
- [59] McCay PB. Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Ann Rev Nutr* 1985;5:323-340.
- [60] Milczarek R, Klimek J, Zelewski L. The effects of ascorbate and alpha-tocopherol on the NADPH-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *Mol Cell Biochem* 2000;210:65-73.
- [61] Gholami S, Hosseini MJ, Jafari L, Omidvar F, Kamalinejad M, Mashayekhi V, Hosseini SH, Kardan A, Pourahmad J, Eskandari MR. Mitochondria as a Target for the Cardioprotective Effects of *Cydonia oblonga* Mill. and *Ficus carica* L. in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. *Drug Res* 2017;67:358-365.
- [62] Solanki ND, Bhavsar SK. An evaluation of the protective role of *Ficus racemosa* Linn. in streptozotocin-induced diabetic neuropathy with neurodegeneration. *Indian J Pharmacol* 2015;47:610-615.
- [63] Brimson JM, Brimson SJ, Brimson CA, Rakkhitawatthana V, Tencomnao T. *Rhinacanthus nasutus* Extracts Prevent Glutamate and Amyloid- β Neurotoxicity in HT-22 Mouse Hippocampal Cells: Possible Active Compounds Include Lupeol, Stigmasterol and β -Sitosterol. *Int J Mol Sci* 2012;13:5074-5097.
- [64] Papi Reddy K, Singh AB, Puri A, Srivastava AK, Narender T. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their *in vivo* antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19:4463-4466.
- [65] Takhshid MA, Tavasuli AR, Heidary Y, Keshavarz M, Kargar H. Protective effect of vitamins E and C on endosulfan-induced reproductive toxicity in male rats. *Iran J Med Sci* 2012;37:173-180.
- [66] Kim WS, Kim I, Kim WK, Choi JY, Kim DY, Moon SG. Mitochondria-Targeted Vitamin E Protects Skin from UVB-Irradiation. *Biomol Ther (Seoul)* 2016;24:305-311.
- [67] Wu TK, Wei CW, Pan YR, Cherng SH, Chang WJ, Wang HF, Yu YL. Vitamin C attenuates the toxic effect of aristolochic acid on renal tubular cells via decreasing oxidative stress-mediated cell death pathways. *Mol Med Rep* 2015;12:6086-6092.

- [68] Qi X, Cai Y, Gong L, Liu L, Chen F, Xiao Y, Wu X, Li Y, Xue X, Ren J. Role of mitochondrial permeability transition in human renal tubular epithelial cell death induced by aristolochic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;222:105-110.
- [69] Sultana S, Saleem M, Sharma S, & Khan N. Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin. *Indian J Exp Biol* 2003;41:827-831.
- [70] Sudhahar V, Veena CK, Varalakshmi P. Antiurolithic Effect of Lupeol and Lupeol Linoleate in Experimental Hyperoxaluria. *J Nat Prod* 2008;71:1509-1512.
- [71] Bodas R, Prieto N, López-Campos O, Giráldez FJ, Andrés S. Naringin and vitamin E influence the oxidative stability and lipid profile of plasma in lambs fed fish oil. *Res Vet Sci* 2011;91:98-102.

8. Anexos

Anexo 1. Análisis CG-SM de los compuestos identificados en el EAFC (datos no publicados) [27].

Compuestos	TR (min)	Área	Total (%)	IUPAC
1	20.687	10081309	7.365	Fitol
2	29.535	32684512	23.877	Escualeno
3	32.892	11809336	8.627	Stigmastan-3,5-dieno
4	33.450	57988698	42.363	Vitamina E
5	36.728	9528161	6.961	β - Sitosterol
6	38.416	11716813	8.560	Lupeol

TR (Tiempo de retención), IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, sistema empleado para nombrar a los compuestos).

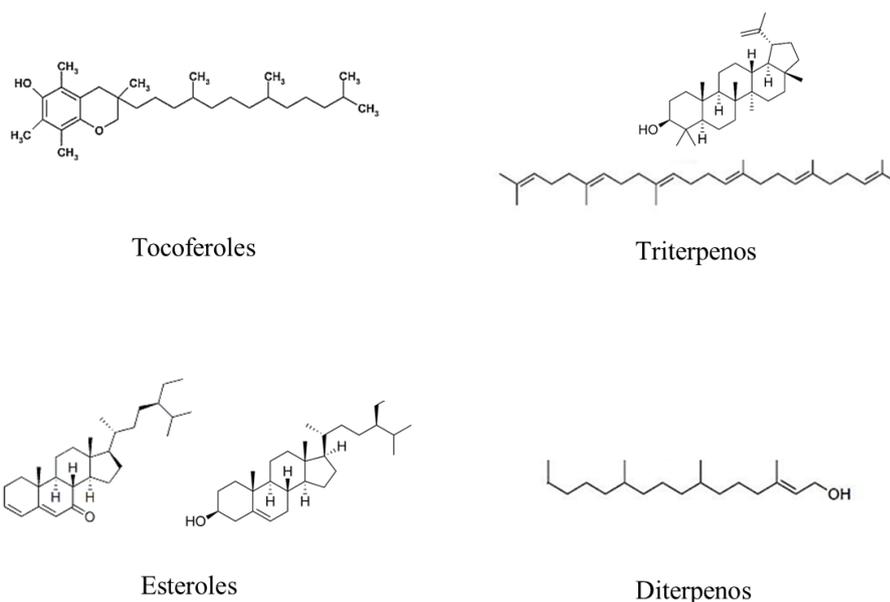


Fig. 3 Estructura química de los compuestos del EAFC de hojas de *F. crocata* agrupados en familias (datos no publicados) [27].