

# Tlamati Sabiduría



## Efecto de $\alpha$ -tocoferol y escualeno sobre la viabilidad y el estrés oxidativo de líneas celulares tumorales cervicales SiHa y no tumorales HaCaT

Merary Guadalupe Parra-Vargas<sup>1</sup>  
Brenda De la Cruz-Concepción<sup>1</sup>  
Ana Elvira Zacapala-Gómez<sup>1</sup>  
Napoleón Navarro-Tito<sup>1</sup>  
Mónica Espinoza-Rojo<sup>1</sup>  
Patricia Álvarez-Fitz<sup>1</sup>  
Carlos Ortuño-Pineda<sup>1</sup>  
Francisco Javier Camacho-Arroyo<sup>2</sup>  
César Sotelo-Leyva<sup>1</sup>  
Eduardo Castañeda-Saucedo<sup>1</sup>  
Miguel Angel Mendoza-Catalán<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Guerrero, México.

<sup>2</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional. San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, 07360 Ciudad de México, CDMX.

\*Autor de correspondencia  
[mamendoza@uagro.mx](mailto:mamendoza@uagro.mx)

### Resumen

El estrés oxidativo provoca daño a biomoléculas y favorece el desarrollo y progresión de enfermedades, como el cáncer. En estudios previos, el extracto acetónico de hojas de *Ficus crocata*, mostró actividad antioxidante en células no tumorales, mientras que indujo citotoxicidad en células tumorales, siendo

### Información del Artículo

#### Como citar el artículo:

Parra-Vargas, M.G., De la Cruz-Concepción, B., Zacapala-Gómez, A.E., Navarro-Tito, N., Espinoza-Rojo, M., Álvarez-Fitz, P., Ortuño-Pineda, C., Camacho-Arroyo, F.J., Sotelo-Leyva, C., Castañeda-Saucedo, E., Mendoza-Catalán, M.A. (2023). Efecto de  $\alpha$ -tocoferol y escualeno sobre la viabilidad y el estrés oxidativo de líneas celulares tumorales cervicales SiHa y no tumorales HaCaT. *Tlamati Sabiduría*, 15, 13-27.

Editores Invitados: Dr. Carlos Ortuño-Pineda; Dra. Mayrut Osdely Urióstegui-Acosta

Recibido en la versión aceptada por los editores invitados: 19 de marzo 2023; Publicado: 13 de junio 2023



$\alpha$ -tocoferol y escualeno los compuestos de mayor abundancia. *Objetivo:* Evaluar el efecto de  $\alpha$ -tocoferol y escualeno sobre la viabilidad y el nivel de estrés oxidativo en células no tumorales HaCaT y células tumorales cervicales SiHa. *Materiales y métodos:* Se determinó la concentración inhibitoria media contra los radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup>; mediante el ensayo MTT se evaluó la viabilidad de las células HaCaT y SiHa y se determinaron los niveles de malondialdehído (MDA) para evaluar la lipoperoxidación. *Resultados:*  $\alpha$ -Tocoferol mostró actividad inhibitoria para ambos radicales (CI<sub>50</sub> DPPH= 1,015.27  $\mu$ g/mL, CI<sub>50</sub> ABTS= 261.62  $\mu$ g/mL), mientras que escualeno no presentó actividad antiradical por sí solo, sin embargo, la actividad antiradical de  $\alpha$ -tocoferol aumentó >10% cuando se combinó con escualeno. La exposición a los compuestos disminuyó el porcentaje de células SiHa viables (23.7 % respecto del control), en contraste, el porcentaje de células HaCaT viables no disminuyó. El tratamiento con escualeno disminuyó el daño oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células SiHa (30-60%) y HaCaT (100-180%), mostrando actividad antioxidante en ambas líneas celulares, sin embargo, el tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol favoreció el daño oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células SiHa (>200% adicional), mientras que disminuyó el nivel de MDA en células HaCaT. *Conclusiones:*  $\alpha$ -tocoferol inhibe a los radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup>; escualeno sinergiza con  $\alpha$ -tocoferol para mejorar su actividad antioxidante. El tratamiento con  $\alpha$ -tocoferol y escualeno mostró un efecto citotóxico en células tumorales SiHa, sin afectar a las células no tumorales HaCaT. Finalmente,  $\alpha$ -tocoferol mostró actividad antioxidante en células no tumorales HaCaT y un efecto prooxidante en células tumorales SiHa.

**Palabras clave:**  $\alpha$ -tocoferol, escualeno, DPPH, ABTS<sup>+</sup>, MDA, HaCaT, SiHa.

## Abstract

Oxidative stress causes damage to biomolecules and can stimulate the development and progression of diseases such as cancer. It has been shown that some compounds with antioxidant activity in non-tumor cells can have a cytotoxic effect on tumor cells. In previous studies, the acetone extract from *Ficus crocata* leaves showed this behavior, being  $\alpha$ -tocopherol and squalene the most abundant compounds. *Objective:* To evaluate the effect of exposure to  $\alpha$ -tocopherol and squalene on the viability and level of oxidative stress in non-tumorigenic HaCaT and cervical SiHa tumor cells. *Materials and methods:* Mean inhibitory concentration of  $\alpha$ -tocopherol and squalene against DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals were determined. The viability of HaCaT and SiHa cells was determined using MTT assays. Malondialdehyde (MDA) levels were determined to assess lipoperoxidation. *Results:*  $\alpha$ -tocopherol showed inhibitory activity for both radicals (IC<sub>50</sub> DPPH= 1,015.27  $\mu$ g/mL, IC<sub>50</sub> ABTS<sup>+</sup> = 261.62 $\mu$ g/mL), while squalene did not show antiradical activity alone; however, the antiradical activity of  $\alpha$ -tocopherol increased by more than 10% when the compounds were combined. Exposure to the compounds decreased the percent of SiHa cells (23.7 % concerning the control); in contrast, the percent of viable HaCaT cells did not reduce (remained above 100%). Treatment with squalene decreased (SiHa: between 30 and 60%, HaCaT: between 100 and 180%) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage, showing antioxidant activity in both cell lines; however, treatment with  $\alpha$ -tocopherol favored H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in SiHa cells (up to 200 % more), while it decreased the level of MDA in HaCaT cells. *Conclusions:*  $\alpha$ -tocopherol inhibits DPPH and ABTS<sup>+</sup> radicals; squalene synergizes with  $\alpha$ -tocopherol to enhance its antioxidant activity. Treatment with  $\alpha$ -tocopherol and squalene showed a moderate cytotoxic effect on SiHa tumor cells without affecting HaCaT non-tumor cells. Finally,  $\alpha$ -tocopherol showed antioxidant activity in HaCaT non-tumor cells and a pro-oxidant effect in SiHa tumor cells.

**Keywords:**  $\alpha$ -tocopherol, squalene, DPPH, ABTS<sup>+</sup>, MDA, HaCaT, SiHa.

## Introducción

El término estrés oxidativo (OS por sus siglas en inglés), puede describirse como un desequilibrio entre moléculas oxidantes y enzimas antioxidantes, a favor de los oxidantes, lo que conduce a una interrupción de la señalización redox y el control o daño molecular (Sies H., 2018). El OS ocurre cuando la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) en el cuerpo excede la capacidad de las células para neutralizarlas y eliminarlas, por medio de un par de maquinarias antioxidantes: componentes enzimáticos y compuestos no enzimáticos de bajo peso molecular (Li *et al.*, 2018; Katerji *et al.*, 2019).

Los oxidantes son moléculas que contienen oxígeno (ROS) o nitrógeno (especies reactivas de nitrógeno, RNS por sus siglas en inglés), pero son las ROS las más estudiadas (Sies H., 2018). Los niveles basales de ROS están involucrados en la activación de la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, motilidad y vías sensibles al estrés, mientras que el aumento de los niveles de ROS puede inducir daño oxidativo a ácidos nucleicos, lípidos y proteínas (Prasad *et al.*, 2017; Chikara, *et al.*, 2018). Si bien este daño ocasionado por las ROS afecta a la mayoría de los tipos de biomoléculas, la aparición de oxidación en los lípidos (peroxidación lipídica, LPO por sus siglas en inglés) provoca la degradación de la bicapa lipídica que compone las membranas celulares, favoreciendo el desarrollo de estados patológicos que incluyen inflamación, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, así como degeneración ocular y renal (Gaschler y Stockwell, 2017; Agmon y Stockwell, 2017).

Existe suficiente evidencia de que las ROS pueden promover o suprimir la supervivencia de las células cancerosas debido a que están implicadas en todos y cada uno de los pasos del desarrollo del tumor, incluida la transformación celular, supervivencia, proliferación, invasión, metástasis y angiogénesis. Las ROS afectan a moléculas de señalización necesarias para la progresión del ciclo celular y la expresión de varios genes supresores de tumores, respectivamente, regulando la inflamación crónica como uno de los principales mediadores del cáncer, por medio de distintas vías de

señalización como, MAPK, VEGF / VEGFR, MMP y PTEN (Wang *et al.*, 2019; Aggarwal *et al.*, 2019). La mayoría de los agentes quimioterapéuticos y radioterapéuticos disponibles actualmente, inducen la muerte de las células cancerosas al aumentar el nivel de ROS y por lo tanto induciendo estrés oxidativo (Prasad *et al.*, 2016).

En relación con el cáncer cervicouterino (CaCU), que es provocado principalmente por el Virus del Papiloma Humano (VPH), se ha observado una elevada expresión de SOD2, la enzima encargada de la regulación redox, debido a que el estrés oxidativo se asocia a la infección persistente por el VPH, que a su vez provoca cambios en la expresión y función de las enzimas antioxidantes (Termini *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2018).

Los organismos aerobios poseen sistemas de defensa antioxidante con la finalidad de disminuir el daño ocasionado por los radicales libres, incluyendo enzimas y secuestradores químicos llamados antioxidantes, moléculas que sintetiza el organismo de manera natural o que se pueden adquirir en la dieta, pues se encuentran presentes en los alimentos (Jamanca-González y Alfaro-Cruz, 2017; Sánchez-Valle y Méndez-Sánchez, 2018).

La función de los antioxidantes consiste en inactivar radicales libres, o bien, oxidándose ellos mismos para inhibir otras reacciones de oxidación. Por esta razón, los antioxidantes a menudo resultan ser agentes reductores tales como tioles o polifenoles (Jamanca-González y Alfaro-Cruz, 2017). Un ejemplo de un antioxidante muy común es la vitamina C, que, al ser aplicada sobre la piel, cumple con una función de protección contra la radiación UV, un tipo de radiación no ionizante solar, debido a que los queratinocitos pueden acumular este compuesto y promover la expresión de las enzimas antioxidantes (Pullar *et al.*, 2017). La capacidad antioxidante de las plantas, se atribuye a los compuestos fenólicos presentes que cuentan con una estructura química con grupos hidroxilo, los cuales actúan como moléculas antioxidantes primarias en el inicio o en la terminación del proceso oxidativo (Chen *et al.*, 2013). Por ejemplo, los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes, inhibiendo radicales libres

debido a su capacidad de transferir un átomo de hidrógeno a una especie radical (Malig *et al.*, 2017). Dentro del género *Ficus*, existe una gran variedad de especies que se ha reportado tienen actividad antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriana, analgésica, entre otras (Abusufyan *et al.*, 2018). En algunas especies de *Ficus*, como son, *F. ingens*, *F. cordata* y *F. palmata*, se ha logrado identificar el contenido polifenólico que favorece a un efecto protector contra el estrés oxidativo (Al-Musayeib, *et al.*, 2017). En un estudio reciente realizado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro), se observó que los extractos de hojas de *Ficus crocata* mostraron un efecto citotóxico en células de cáncer de mama MDA-MB-231 y células de cáncer cervical HeLa y SiHa (Sánchez-Valdeolivar *et al.*, 2020; De La Cruz-Concepción *et al.*, 2021). Además, se observó que el extracto acetónico de hojas de *F. crocata* (EAFc) posee actividad antioxidante y mostró un efecto protector sobre el daño oxidativo en las células no tumorales HaCaT, evitando la lipoperoxidación y citotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Cabe destacar que, en la caracterización fitoquímica del extracto, los metabolitos que se encontraron en mayor concentración fueron  $\alpha$ -tocoferol y escualeno (De la Cruz-Concepción *et al.*, 2021), dos metabolitos considerados antioxidantes.

El  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ T) representa la forma principal de vitamina E en los tejidos y es un lípido esencial para los eucariotas superiores, dentro de la naturaleza puede presentarse como ocho análogos; tocoferoles y tocotrienoles, en formas  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -, sin embargo, solo el  $\alpha$ T alcanza niveles plasmáticos altos y es considerado esencial, actuando como un antioxidante químico al prevenir la peroxidación lipídica (Jiang, 2014; Galli *et al.*, 2017; Azzi, 2018). Se ha reportado que la Vitamina E afecta la actividad de los receptores y las enzimas involucradas en la regulación de la expresión de genes asociados a reacciones de óxido reducción (Zingg, 2019). Por otra parte, se sabe que la Vitamina E puede participar en la prevención del cáncer de distintas maneras, tanto a nivel nutricional como a nivel molecular. Las bases moleculares del mecanismo de acción de la Vitamina E radican en su actividad

antioxidante, además de la unión directa a moléculas blanco, importantes en el desarrollo tumoral (Azzi, 2018). Se ha reportado que distintas formas de Vitamina E disminuyeron la proliferación e indujeron apoptosis en células de carcinoma escamoso oral (Sylvester *et al.*, 2014; Zulkapli *et al.*, 2017). En eritrocitos tratados con  $\alpha$ T, se ha observado actividad contra la lipoperoxidación ocasionada por radicales hidroxilo (OH), sin afectar a los iones férricos presentes en la fase acuosa (Fernandes *et al.*, 2013) además de que, la ingesta de Vitamina E y su nivel en sangre, está relacionada con un menor riesgo de neoplasia cervical (Hu *et al.*, 2017).

El escualeno (Sq) es un metabolito clave en la vía de los esteroides y es fundamental en la regulación de la fisiología celular en organismos eucariotas, además, es de los componentes principales presentes en las grasas, en conjunto con los triglicéridos y los ésteres. Varios estudios indican un papel dual del compuesto ligado principalmente a su estructura química: la posible implicación de Sq en la respuesta celular antioxidante y, por otro lado, su posible contribución en la exacerbación de los efectos perjudiciales de las enfermedades asociadas a estrés oxidativo (Micera *et al.*, 2020). En lípidos de la superficie de piel humana se observó que escualeno puede participar en diferentes mecanismos de oxidación, como el singlete de oxígeno y oxidación de radicales libres, generando distintos isómeros de monohidroperóxido de Sq (SQOOH) que pueden ser útiles para predecir mecanismos de oxidación en varias muestras, lo que podría ser útil para el estudio y prevención de enfermedades de la piel y deterioro de alimentos a través de la regulación de la oxidación del escualeno (Shimizu *et al.*, 2019). En cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas se han determinado elevados los niveles de prenilación de las proteínas (adición de moléculas hidrofóbicas a una proteína) y se ha visto también que están relacionadas con la biosíntesis de dos isoprenoides en particular, el pirofosfato de farnesilo y pirofosfato de geranilgeranilo junto con Sq como un metabolito río abajo de ambos compuestos, por lo tanto, la biosíntesis de Sq se ha sugerido como una potencial estrategia terapéutica (Park *et al.*, 2014). Sq actúa como metabolito intermediario en la

biosíntesis del colesterol, y sus propiedades han sido estudiadas en diversos tipos de líneas celulares tumorales, en donde se ha reportado la inhibición de la proliferación, invasión y metástasis tras el knockout de la enzima escualeno epoxidasa, que es la enzima encargada de metabolizar al Sq y se ha considerado recientemente como un oncogén (Qin *et al.*, 2017; Cirmena *et al.*, 2018; Mahoney *et al.*, 2019). Considerando que en un estudio previo  $\alpha$ T y Sq fueron los compuestos más abundantes en el extracto de *F. crocata*, que mostró un efecto citotóxico contra células tumorales y un efecto protector en células no tumorales, la intención de este estudio fue evaluar el efecto de los compuestos puros  $\alpha$ T y Sq sobre la viabilidad y el nivel de estrés oxidativo en células tumorales SiHa y no tumorales HaCaT. Este estudio aporta información sobre el posible uso de estos compuestos como terapia complementaria contra cáncer, y su papel como antioxidantes en células no tumorales.

## Materiales y métodos

### *Ensayo de actividad antiradical (DPPH y ABTS+)*

Se realizaron diluciones dobles seriadas de los compuestos  $\alpha$ T y Sq a concentraciones de 50 a 800  $\mu$ g/mL en placas de 96 pozos. Para las combinaciones de los compuestos, se realizaron diluciones seriadas de  $\alpha$ T a concentraciones de 12.5 a 100  $\mu$ g/mL y se añadieron 50  $\mu$ g/mL de Sq. Se agregaron 150  $\mu$ L de la solución de DPPH y ABTS<sup>+</sup>, por separado. Las placas se dejaron en incubación por 30 min., en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la lectura de la absorbancia se realizó en un lector de microplacas (Star Fax 2100, Awareness Technologies), para DPPH a 545 nm y para ABTS<sup>+</sup> a 734 nm. El ácido ascórbico fue utilizado como antioxidante estándar como control positivo, mientras que, para el control negativo, se utilizaron solo los radicales (De la Cruz-Concepción *et al.*, 2021).

Los valores de las absorbancias, fueron utilizados para determinar el porcentaje de inhibición de los radicales y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(1 - \frac{Ab \text{ muestra}}{Ab \text{ control}}\right) \times 100$$

Donde Ab representa la absorbancia de las muestras.

La concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub>) de ambos radicales se determinó por medio de una regresión lineal (Y= mX + b) en el programa Graphpad prism v6.0 (De la Cruz-Concepción *et al.*, 2021).

### *Cultivo de células*

Las células HaCaT (no tumorales) y SiHa (tumorales cervicales, VPH-16+), fueron cultivadas en medio DMEM/F12 enriquecido con 10% de SFB y 1% de A/A a 37° C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta una confluencia del 80%. Posteriormente, las células fueron cosechadas y sembradas en las condiciones adecuadas para cada determinación.

### *Ensayo MTT*

Se sembraron 5x10<sup>3</sup> células HaCaT y SiHa en placas de 96 pocillos con medio DMEM/F12 con 10% de SFB durante 24 h. Posteriormente, las células fueron tratadas con  $\alpha$ T y Sq 25-1000  $\mu$ g/mL diluidos en medio DMEM/F12 5% SFB durante 24 y 48 h. Las combinaciones de los compuestos se realizaron colocando 50-1000  $\mu$ g/mL de  $\alpha$ T más 50  $\mu$ g/mL de Sq. Transcurrido el tiempo, se agregaron 100  $\mu$ L de reactivo MTT 10% y se incubaron durante 4 h para permitir la formación de cristales de formazán, posteriormente se añadió isopropanol (0.04 N) para disolver los cristales. La absorbancia se leyó a 545 nm en un lector de placas ELISA y fue proporcional al número de células viables (De la Cruz-Concepción *et al.*, 2021). El porcentaje de viabilidad celular fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\text{Células viables} = \left(\frac{Ab \text{ muestra}}{Ab \text{ control}}\right) \times 100$$

Como control (vehículo), las células fueron tratadas con el diluyente de los compuestos (DMSO <1%); como control positivo las células fueron expuestas a Cisplatino (100  $\mu$ M) para inducir muerte celular; como control negativo, las células se trataron con medio DMEM/F12 10% SFB, para favorecer la proliferación celular.

### Determinación de estrés oxidativo/lipoperoxidación (malondialdehído)

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células HaCaT y SiHa en placas de 6 pozos, hasta una confluencia del 80%, posteriormente se desechó el medio de cultivo y se realizó un pretratamiento con los compuestos  $\alpha$ T, Sq y sus combinaciones durante 24h. Para las células tumorales SiHa, las concentraciones fueron las siguientes:  $\alpha$ T (200  $\mu$ g/mL), Sq (400  $\mu$ g/mL), una combinación de (400  $\mu$ g/mL), para las células HaCaT:  $\alpha$ T (200  $\mu$ g/mL), Sq (50  $\mu$ g/mL), y la combinación (400  $\mu$ g/mL) diluidos en medio DMEM/F12 5% SFB. Transcurrido el tiempo de los tratamientos, se añadió  $H_2O_2$  (0.1 M) durante 2 h. Las células fueron tripsinizadas y se resuspendieron en 70  $\mu$ L de Tris-HCl y se homogenizaron en vórtex por 1 min. Se mezclaron 50  $\mu$ L del sobrenadante y 50  $\mu$ L de Tris-HCl, 325  $\mu$ L de reactivo MPI [10 mM] y 100  $\mu$ L de HCl [37%], se agitaron y se incubaron por 40 min a 45°C, se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se realizó la lectura de la absorbancia a 586 nm (NanoDrop 2000C). El porcentaje de MDA se calculó con la siguiente fórmula (De la Cruz-Concepción *et al.*, 2021):

$$\% = \frac{AbMDA \text{ gpo trat}/Prot \text{ tot gpo trat}}{AbMDA \text{ control}/Prot \text{ tot gpo cont}} \times 100$$

Donde AbMDA representa la absorbancia de cada una de las muestras de MDA; grp trat = grupo tratado; Prot tot gpo trat = Proteína total grupo tratado; Prot tot gpo cont = Proteína total grupo control.

La normalización de los datos de cada muestra se determinó por medio del ensayo de Bradford. En tubos Eppendorf, se colocaron 1, 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu$ L de BSA y 49, 48, 44, 42 y 40  $\mu$ L de agua Milli Q, respectivamente. A todos los tubos se les agregaron 450  $\mu$ L del reactivo de Bradford. La lectura de absorbancia se obtuvo a 595/750 nm (NanoDrop 2000C).

### Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad Prism 6.0 para la captura y el análisis de datos. Para la evaluación de las diferencias entre los grupos de datos respecto del control, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, y la prueba de comparación

múltiple de Dunnett; los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos. La  $CI_{50}$  para viabilidad celular y actividad antiradical fue calculada usando regresión lineal y la ecuación de la recta ( $y = mx + b$ ).

### Resultados

#### $\alpha$ T y Sq sinergizan mostrando una mayor actividad antiradical

Para conocer la actividad antiradical de los compuestos, se utilizaron los radicales libres DPPH y ABTS<sup>+</sup>.  $\alpha$ T mostró actividad inhibitoria sobre los radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup> de manera dependiente a la concentración (Figura 1). Para el DPPH (Figura 1A), el porcentaje de inhibición aumentó notoriamente a partir de 400  $\mu$ g/mL.

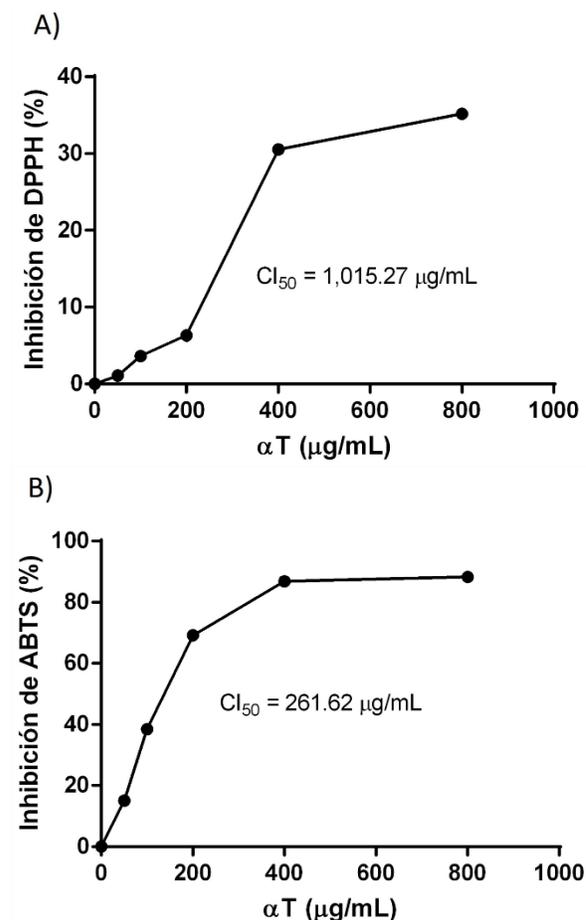


Figura 1. Efecto de inhibición sobre los radicales libres por  $\alpha$ T. A): radical DPPH; B): radical ABTS<sup>+</sup>.

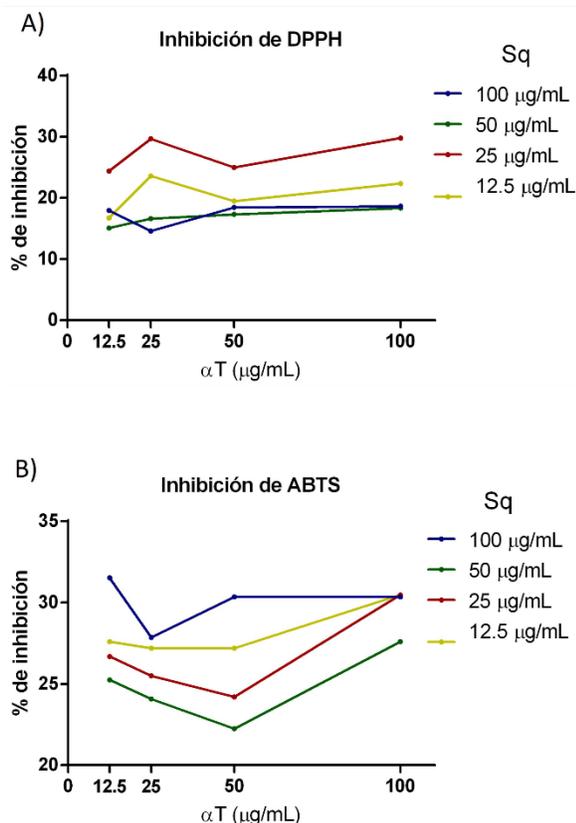


Figura 2. Actividad antiradical de combinaciones de  $\alpha T$  y Sq. A): radical DPPH; B): radical ABTS<sup>+</sup>.

alcanzando un 30% de inhibición, mientras que para el ABTS<sup>+</sup> se observó un 15% de inhibición desde 50  $\mu g/mL$  y fue aumentando de forma dependiente a la concentración hasta un 88% (Figura 1B). La  $CI_{50}$  de  $\alpha T$  para el DPPH fue de 1,015.27  $\mu g/mL$ , mientras que para el ABTS<sup>+</sup> de 261.62  $\mu g/mL$ . En contraste, Sq no mostró actividad antiradical en ninguna de las concentraciones analizadas.

Adicionalmente, se realizaron combinaciones de los compuestos  $\alpha T$  y Sq en concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100  $\mu g/mL$ , con la técnica de tablero de ajedrez. Interesantemente, la combinación de los compuestos mostró una mayor actividad inhibitoria para ambos radicales (Figura 2);  $\alpha T$  tuvo un porcentaje de inhibición para el DPPH de 1 y 3% con concentraciones de 50 y 100  $\mu g/mL$ , respectivamente, este porcentaje aumentó hasta los 17.4% y 18.7% tras combinarlo con Sq (Figura 2A). En el caso del ABTS<sup>+</sup>,  $\alpha T$  individualmente, mostró una actividad inhibitoria

mayor en comparación con la combinación con Sq. Sin embargo, en las combinaciones de concentraciones menores a 50  $\mu g/mL$  de  $\alpha T$  el porcentaje de inhibición fue mayor (Figura 2B). Se obtuvo un porcentaje de inhibición de ABTS<sup>+</sup> de 27.6 %, 25.5 % y 22.3 % con 12.5  $\mu g/mL$ , 25  $\mu g/mL$  y 50  $\mu g/mL$  de  $\alpha T$ , respectivamente, en combinación con 50  $\mu g/mL$  de Sq. Con la combinación de los compuestos, el porcentaje de inhibición para ambos radicales aumentó más del 10%, lo que se puede interpretar como un efecto sinérgico entre  $\alpha T$  y Sq.

#### *$\alpha T$ y Sq disminuyen la proliferación de células tumorales SiHa*

Se determinó el porcentaje de viabilidad en células HaCaT y SiHa después de haber sido tratadas con distintas concentraciones de  $\alpha T$  y Sq (25-1000  $\mu g/mL$ ) y sus combinaciones (50-800  $\mu g/mL$ ) en tiempos de exposición de 24 y 48 h. En las células tumorales SiHa, los compuestos  $\alpha T$ , Sq y su combinación, disminuyeron alrededor de un 20% el número de células viables. En los tratamientos por 24 h, las concentraciones que mostraron un efecto citotóxico fueron  $\alpha T$  25-50  $\mu g/mL$  (Figura 3A), Sq 25-400  $\mu g/mL$  (Figura 3C) y la combinación  $\alpha T/Sq$  800/50  $\mu g/mL$  (Figura 3D). Para los tratamientos por 48 h, solamente el tratamiento con Sq 400-1000  $\mu g/mL$  (Figura 3D) y  $\alpha T$  12.5  $\mu g/mL$  mantuvieron el número de células SiHa viables alrededor del 80%.

En contraste, en las células no tumorales HaCaT, no se observó efecto citotóxico del tratamiento con los compuestos independientes ni su combinación, incluso algunas condiciones de tratamiento aumentaron el porcentaje de células viables en comparación con las células sin tratamiento (V), principalmente a 24 h:  $\alpha T$  50, 400 y 800  $\mu g/mL$  (Figura 4A), así como la combinación de estas últimas dos concentraciones con 50  $\mu g/mL$  de Sq (Figura 4E), además de Sq 25  $\mu g/mL$  (Figura 4C). En 48 h de tratamiento, sólo las concentraciones de 100 y 200  $\mu g/mL$  de Sq, mostraron un mayor porcentaje de células viables en comparación con el control (Figura 4D), el resto de los tratamientos no mostró diferencias estadísticas significativas respecto de las células sin tratamiento.

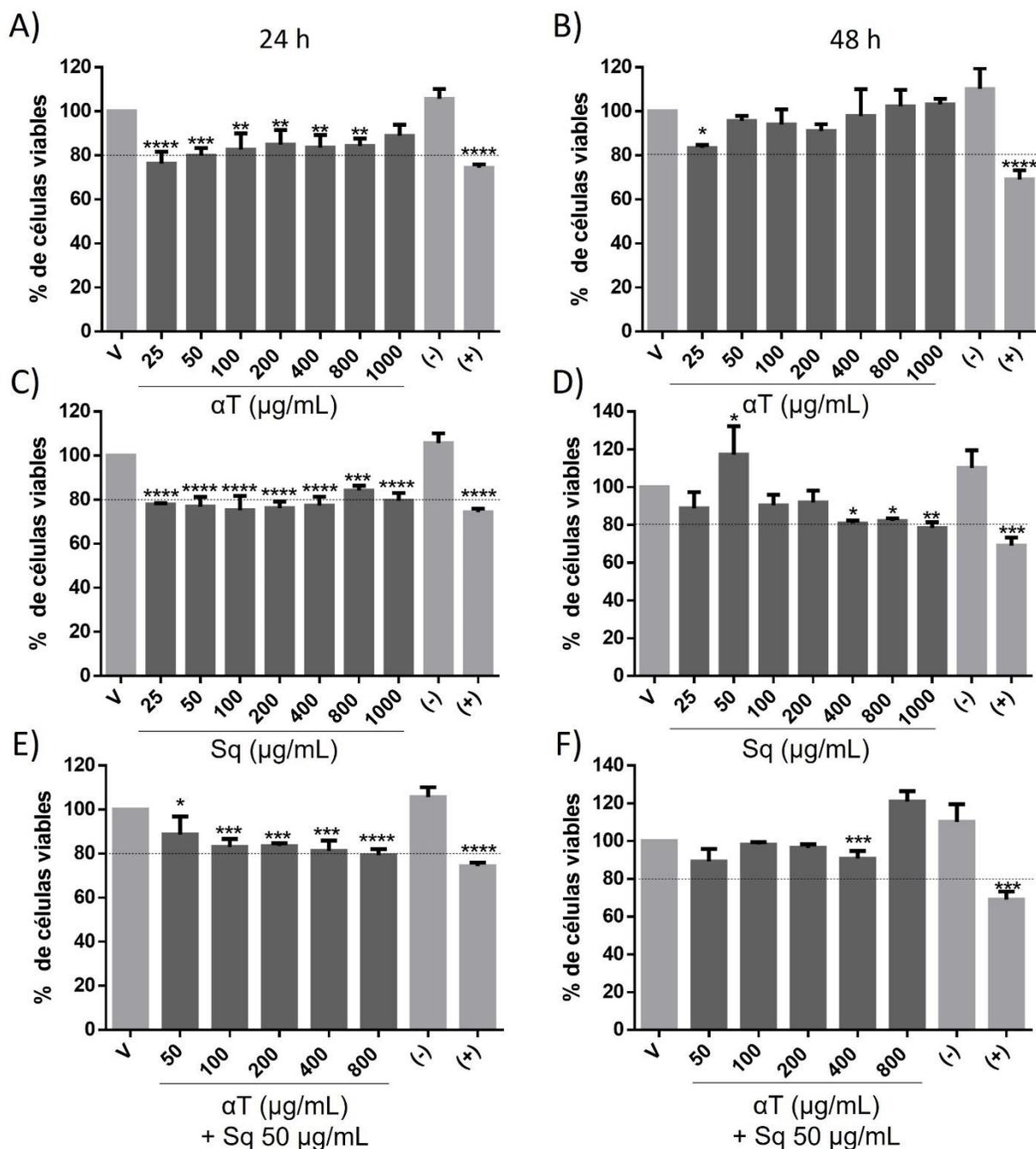


Figura 3. Efecto de  $\alpha$ T, Sq y sus combinaciones sobre la viabilidad de células SiHa. A) y B): Células tratadas con diferentes concentraciones de  $\alpha$ T por 24 y 48, respectivamente; C) y D): Células tratadas con diferentes concentraciones de Sq 24 y 48, respectivamente; E) y D): Células tratadas con diferentes combinaciones de  $\alpha$ T y Sq por 24 y 48, respectivamente; V: Vehículo (DMSO 10%), (-): control negativo, DMEM/F12 SFB 10%. (+): control positivo, Cisplatino 100  $\mu$ M. ANOVA de una vía, prueba de Dunnett: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$  versus V.

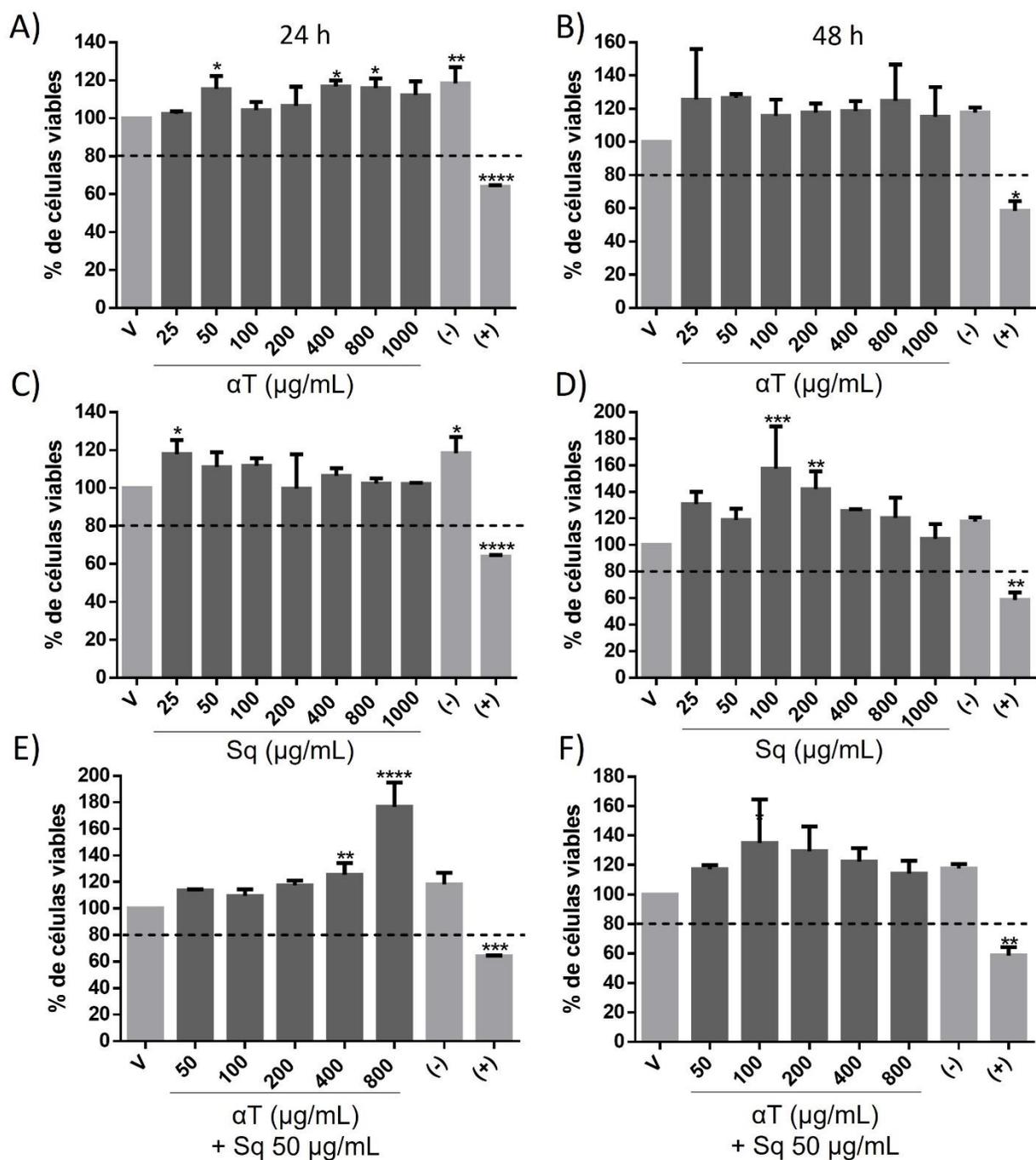


Figura 4. Efecto de  $\alpha$ T, Sq y sus combinaciones sobre la viabilidad de células HaCaT. A) y B): Células tratadas con diferentes concentraciones de  $\alpha$ T por 24 y 48, respectivamente; C) y D): Células tratadas con diferentes concentraciones de Sq 24 y 48, respectivamente; E) y D): Células tratadas con diferentes combinaciones de  $\alpha$ T y Sq por 24 y 48, respectivamente; V: Vehículo (DMSO 10%), (-): control negativo, DMEM/F12 SFB 10%. (+): control positivo, Cisplatino 100  $\mu$ M. ANOVA de una vía, prueba de Dunnett: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$  versus V.

*αT* mostró un efecto prooxidante en las células tumorales SiHa, mientras que se comportó como antioxidante en las células no tumorales HaCaT

Para evaluar el nivel de daño oxidativo (lipoperoxidación), se determinó el nivel de malondialdehído (MDA) en las células HaCaT y SiHa después de haber sido pre-tratadas con *αT* (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Sq (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), y su combinación por tiempos de 24 y 48 h, y posteriormente tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1 M) por 2 h, condiciones que se sabe inducen daño oxidativo (lipoperoxidación) en células HaCaT (De la Cruz-Concepción *et al.*, 2021). En los tratamientos por 24 h en las células tumorales SiHa, solo la combinación de los compuestos (Mix 1: *αT*/Sq; 400/50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) aumentó significativamente el nivel de MDA (>300%) respecto a las células sin tratamiento (Figura 5A). En 48 h, las tres condiciones analizadas mantuvieron la lipoperoxidación inducida por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células SiHa (Figura 5B). El pretratamiento con *αT* durante 48 h, aumentó hasta 641.02 % el nivel de MDA en las células SiHa (Figura 5B) aparentemente en niveles mayores al control positivo, interesantemente, esta condición de tratamiento disminuyó en más del 100% el nivel de MDA en las células no tumorales HaCaT respecto al control positivo ( $p < 0.001$ ) (Figura 6B), de tal modo que no se observaron diferencias estadísticas en el nivel de MDA con estas condiciones de tratamiento respecto a las células no tratadas ( $p > 0.05$ ), lo que sugiere que *αT* protegió a las células no tumorales HaCaT contra el daño oxidativo inducido por el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , comportándose como antioxidante en estas células (Figura 6B). La exposición a Sq y Mix 1 también disminuyeron significativamente el nivel de MDA inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  en células HaCaT principalmente a 48 h (Figura 6), pero en menor medida que el pretratamiento con *αT* durante 48 h.

## Discusión

El daño oxidativo provocado a las biomoléculas por la presencia de estrés oxidativo en el organismo puede conllevar el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Se ha reportado que la terapia contra cáncer puede tener efectos

secundarios en los pacientes que la reciben y afectar su calidad de vida. Por esta razón, continúa la búsqueda de terapias alternativas que permitan a los pacientes mantener la calidad de vida, actuando sobre las células tumorales sin afectar o protegiendo del estrés a las células normales en el organismo.

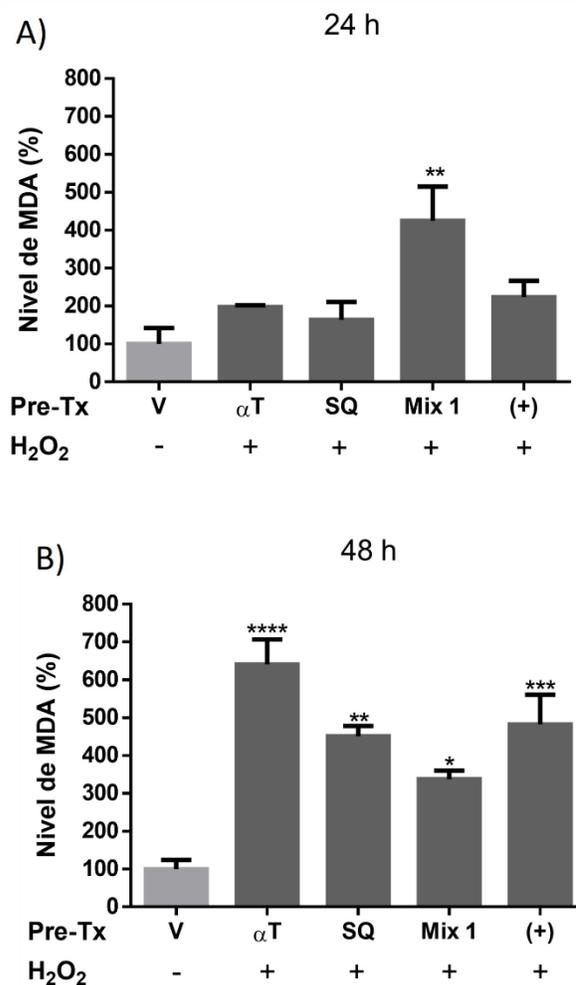


Figura 5. Efecto de *αT*, Sq y sus combinaciones sobre el nivel de estrés oxidativo (lipoperoxidación) en células SiHa: A) Células tratadas por 24 h; B): Células tratadas por 48 h. V: Vehículo; células tratadas con DMEM/F12 5% SFB. *αT* 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sq 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Mix 1: *αT* 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  + Sq 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (+): Control positivo; células tratadas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1 M). ANOVA de una vía, prueba de Dunette en dos momentos: (\*) respecto a V, (\*) respecto a (+);  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

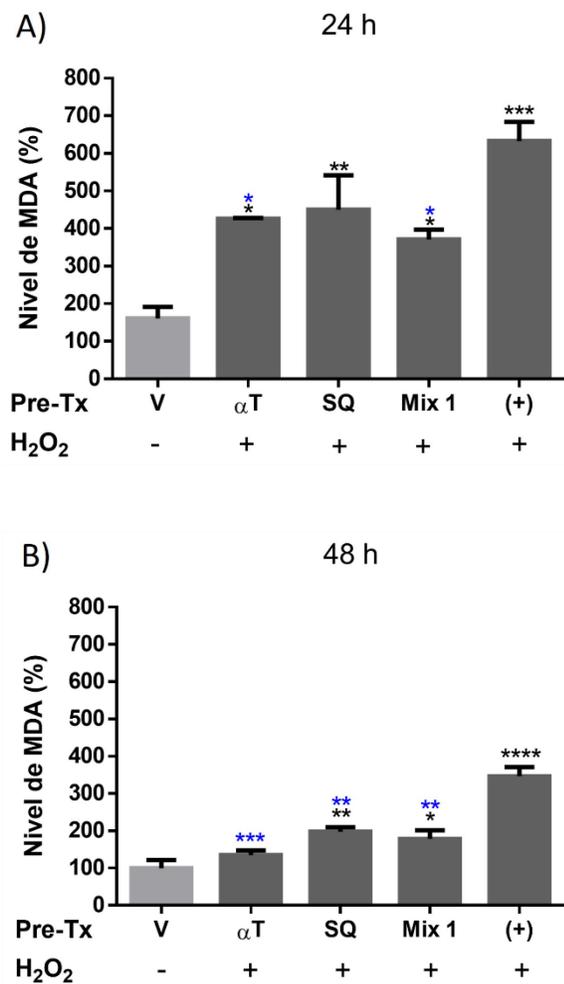


Figura 6. Efecto de  $\alpha$ T, Sq y sus combinaciones sobre el nivel de estrés oxidativo (lipoperoxidación) en células HaCaT: A) Células tratadas por 24 h; B): Células tratadas por 48 h. Ensayo de MDA. V: Vehículo; células tratadas con DMEM/F12 5% SFB.  $\alpha$ T 400  $\mu$ g/ml; Sq 50 $\mu$ g/ml; Mix 1:  $\alpha$ T 400  $\mu$ g/ml + Sq 50 $\mu$ g/ml(+): Control positivo; células tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 M). ANOVA de una vía, prueba de Dunette en dos momentos: (\*) diferencias respecto a V; (\*\*) diferencias respecto a (+);  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

En este estudio,  $\alpha$ T mostró capacidad de inhibición para los radicales ABTS<sup>+</sup> y DPPH, aunque la CI<sub>50</sub> para ABTS<sup>+</sup> fue menor que para DPPH, y puede deberse a que el ABTS es un radical menos selectivo, con mayor estabilidad y de amplio espectro, toda vez que puede actuar con antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (Ilyasov *et*

*al.*, 2020), mientras que el DPPH es un radical más selectivo, de carácter hidrofóbico (Romanet *et al.*, 2019). La capacidad de inhibición de los radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup> por parte de  $\alpha$ T, radica en su composición fenólica, ya que se ha determinado que los compuestos fenólicos pueden disminuir la cantidad de radicales DPPH en concentraciones desde 10 a 30  $\mu$ g/mL, como se ha sugerido, todo depende de la donación de átomos de hidrógeno presentes en el compuesto (Huyut *et al.*, 2017; Ozsoy *et al.*, 2009). Por su parte, el Sq al tratarse de un triterpeno con un isoprenoide y seis dobles enlaces en su estructura (Ramírez-Torres *et al.*, 2011), su capacidad reductora de los radicales se ve limitada, pues no cuenta con los electrones necesarios para ser donados y neutralizar a los radicales. Sin embargo, se sabe que Sq puede actuar en sinergia con  $\alpha$ T (Finotti *et al.*, 2000), y aumentar su capacidad de inhibición a los radicales DPPH y ABTS<sup>+</sup>, lo cual es acorde con las observaciones en el presente estudio.

Respecto al efecto de los compuestos sobre la proliferación celular, para las células tumorales SiHa, el efecto de  $\alpha$ T, Sq y sus combinaciones disminuyendo el porcentaje de células viables fue más evidente a 48 h que a 24 h, esto podría indicar que los compuestos requieren un mayor tiempo de exposición para mostrar el efecto esperado. A pesar de que  $\alpha$ T puede actuar como un agente eficaz en el tratamiento contra el cáncer, se ha reportado que distintas formas de vitamina E ( $\gamma$ T,  $\delta$ T,  $\gamma$ TE,  $\delta$ TE) pueden tener efecto anticancerígeno afectando distintas vías que favorecen la proliferación de células tumorales (Jiang, 2017). En un estudio se demostró que  $\gamma$ T,  $\delta$ T,  $\gamma$ TE y  $\delta$ TE suprimieron el desarrollo de tumores en modelos de cáncer animal, por su parte  $\alpha$ T, fue ineficaz en estudios preclínicos con similitud a estos ensayos (Moya-Camarena y Jiang, 2012).

Por otra parte, ninguna condición de tratamiento disminuyó el número de células no tumorales viables HaCaT, incluso, algunas condiciones favorecieron la proliferación celular, probablemente debido a la capacidad citoprotectora del  $\alpha$ T, como lo reportado por Yoon *et al.* (2018), quienes reportaron que el extracto de soja negra, rico en tocoferoles y carotenoides, favoreció la eliminación de

radicales libres y redujo los niveles intracelulares de ROS, protegiendo a los queratinocitos humanos (Yoon *et al.*, 2018). Estos datos, coinciden con lo reportado por Khallouki *et al.* (2016), que indicaron que los componentes de la VE  $\delta$ -TP favorecen la proliferación en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y T-47D, pero el  $\delta$ -TT ejerce un efecto contrario al inhibir el crecimiento celular (Khallouki *et al.*, 2016).

Por otra parte,  $\alpha$ T incrementó la lipoperoxidación en células SiHa, pero disminuyó los niveles de MDA en las células no tumorales HaCaT, sugiriendo que el  $\alpha$ T podría ejercer un efecto protector en las células no tumorales. Además, de acuerdo con lo mencionado por Górnicka *et al.* (2019), la ingesta de  $\alpha$ T es importante para mantener en óptimo estado el funcionamiento de todo el organismo (Miyazawa *et al.*, 2019). Se sabe que algunos compuestos naturales, como los flavonoides, pueden tener un efecto dual y actuar como antioxidantes en células no tumorales y como prooxidantes en células tumorales, activando vías de apoptosis y regulando a la baja las vías de señalización proinflamatorias (Kopustinskiene *et al.*, 2020). Un ejemplo de esto es el eugenol, que disminuyó el nivel de ATP e inhibió la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos en células de mama MCF-10A transfectadas con H-ras (Yan *et al.*, 2017). Los tratamientos con Sq tuvieron un efecto menor de lipoperoxidación en las células HaCaT, así como Gabás-Rivera *et al.* (2014) mencionan que la ingesta de Sq disminuyó el nivel de ROS en las lipoproteínas y MDA plasmático después de haber sido suministrado a ratones macho, con la finalidad de evaluar el papel de este compuesto en los niveles plasmáticos de lípidos (Gabás-Rivera *et al.*, 2014). Zhu *et al.* (2018) determinaron una actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama MDA-MB-231. A partir de tratamientos combinados de  $\beta$ -sitosterol (esterol) con Genistina (isoflavona) y de Genistina con  $\beta$ -sitosterol, observaron un efecto sinérgico en los resultados, puesto que hubo una disminución en la  $CI_{50}$  de 24.55  $\mu$ M y 37.31  $\mu$ M, respectivamente, además de que, en ensayos de cierre de herida, observaron una reducción en la migración celular de 45.51 y 27.49% (Zhu *et al.*, 2018).

Una limitación de este estudio es que solo se evaluaron dos compuestos de los seis más abundantes en el extracto acetónico de *Ficus crocata*, del cual, como ya se mencionó, se reportó actividad citoprotectora contra el daño oxidativo inducido por  $H_2O_2$  en células no tumorales HaCaT (De La Cruz-Concepción *et al.*, 2021), sin embargo, es posible que otros compuestos presentes en el extracto de hojas de *Ficus crocata* como Fitol, Estigmastan-3-5-dieno,  $\beta$ -sitosterol y Lupeol, tengan un papel importante en el efecto observado con el extracto, o sinergizan con  $\alpha$ T y Sq para mostrar un efecto similar al extracto, sin embargo esta hipótesis aún debe probarse, además de probar el efecto de estos compuestos sobre modelos celulares de otros tipos de cáncer.

## Conclusiones

$\alpha$ T mostró una actividad antioxidante sobre los radicales DPPH y el ABTS<sup>+</sup>, y el efecto mejoró al combinarlo con Sq, lo que puede interpretarse como una acción sinérgica de los compuestos. Por otra parte, el tratamiento con  $\alpha$ T y Sq durante 24h disminuyó el número de células tumorales cervicales SiHa viables en todas las condiciones de tratamiento, en contraste, el porcentaje de células viables no tumorales HaCaT no disminuyó, incluso algunas condiciones aumentaron el número de células viables HaCaT respecto a las células sin tratamiento.  $\alpha$ T mostró actividad antioxidante en las células no tumorales HaCaT, y actividad prooxidante en las células tumorales SiHa principalmente a las 48 h de tratamiento, lo que sugiere que el  $\alpha$ T de forma individual o combinado con escualeno, podría ser útil como terapia complementaria contra cáncer, de modo que sensibilicen a las células tumorales a los fármacos contra cáncer, mientras que protejan a las células no tumorales del estrés oxidativo inducido por el tratamiento, sin embargo, aún se requiere de más estudios que confirmen el uso de  $\alpha$ T, y posiblemente escualeno, puede mejorar la respuesta a los fármacos utilizados contra cáncer.

## Referencias

Abusufyan, S., Ibrahim, M., Mohib, K. (2018). Comparative *in vitro* antidiabetic and

- antioxidant activity of various extracts of *Ficus* species. *Pharmacognosy Journal*, 10, 349-354.
- Aggarwal, V., Tuli, H.S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M.B., Sak, K., Varol, M., Jain, A., Khan, M.A., Sethi, G. (2019). Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*, 9, 735.
- Agmon, E., Stockwell, B.R. (2017). Lipid homeostasis and regulated cell death. *Current Opinion in Chemical Biology*, 39, 83-89.
- Al-Musayeb, N., Ebada, S.S., Gad, H.A., Youssef, F.S., Ashour M.L. (2017). Chemotaxonomic diversity of three *Ficus* species: their discrimination using chemometric analysis and their role in combating oxidative stress. *Pharmacognosy Magazine*, 13(Suppl 3), S613–S622.  
[https://doi.org/10.4103/pm.pm\\_579\\_16](https://doi.org/10.4103/pm.pm_579_16)
- Azzi, A. (2018). Many tocopherols, one vitamin E. *Molecular aspects of medicine*, 61, 92–103.
- Chen, Z., Bertin, R., Frolidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138, 414-20.
- Chikara, S., Nagaprashantha, L.D, Singhal, J. Horne, D., Awasthi, S., Singhal, S.S. (2018). Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters*, 413, 122-134.
- Cirmena, G., Franceschelli, P., Isnaldi, E., Ferrando, L., De Mariano, M., Ballestrero, A., Zoppoli, G. (2018). Squalene epoxidase as a promising metabolic target in cancer treatment. *Cancer Letters*, 425, 13-20.
- De la Cruz-Concepción, B., Espinoza-Rojo, M., Álvarez-Fitz, P., Illades-Aguilar, B., Acevedo-Quiroz, M., Zacapala-Gómez, A.E., Navarro-Tito, N., Jiménez-Wences, H., Torres-Rojas, F. I., Mendoza-Catalán, M.A. (2021). Cytotoxicity of *Ficus Crocata* extract on cervical cancer cells and protective effect against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HaCaT non-tumor cells. *Plants*, 10, 183.
- Fernandes, K.S., Silva, A.H.M, Mendanha, S.A., Rezende, K.R., Alonso, A. (2013). Antioxidant effect of 4-nerolidylcatechol and  $\alpha$ -tocopherol in erythrocyte ghost membranes and phospholipid bilayers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46, 780-788.
- Finotti, E., D'Ambrosio, M., Paoletti, F., Vivanti, V., Quaglia, G. (2000). Synergistic effects of alpha tocopherol, beta-sitosterol and squalene on antioxidant activity assayed by crocin bleaching method. *Nahrung*, 44, 373-374.
- Gabás-Rivera, C., Barranquero, C., Martínez-Beamonte, R., Navarro, M.A., Surra, J.C., Osada, J. (2014). Dietary squalene increases high density lipoprotein-cholesterol and paraoxonase 1 and decreases oxidative stress in mice. *PloS One*, 9, e104224.
- Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J.M., Eggersdorfer, M., Frank, J., Cruciani, G., Lorkowski, S., Özer, N.K. (2017). Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radical Biology and Medicine*, 102, 16-36.
- Gaschler, M.M, Stockwell, B.R (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482, 419-425.
- Górnicka, M., Ciecierska, A., Hamulka, J., Drywień, M.E., Frackiewicz, J., Górnicki, K., Wawrzyniak, A. (2019).  $\alpha$ -Tocopherol protects the heart, muscles, and testes from lipid peroxidation in growing male rats subjected to physical efforts. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 8431057.
- Hu, X., Li, S., Zhou, L., Zhao, M., Zhu, X. (2017). Effect of vitamin E supplementation on uterine cervical neoplasm: A meta-analysis of case-control studies. *PloS One*, 12, e0183395.
- Huyut, Z., Beydemir, Ş., Gülçin, İ. (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research International*, 2017, 7616791.
- Ilyasov, I.R., Beloborodov, V.L., Selivanova, I.A., Terekhov, R.P. (2020). ABTS/PP Decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1131.
- Jamanca-González, N.C, Alfaro-Cruz, S. (2017). *Antioxidantes en los Alimentos*. Lima-Perú. UNAB.
- Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology & Medicine*, 72, 76-90.

- Jiang, Q. (2017). Natural forms of vitamin E as effective agents for cancer prevention and therapy. *Advances in Nutrition* (Bethesda, Md.), 8, 850–867.
- Katerji, M., Filippova, M., Duerksen-Hughes P. (2019). Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1279250.
- Khallouki, F., de Medina, P., Caze-Subra, S., Bystricky, K., Balaguer, P. Poirou, M., Silvente-Poirot, S. (2016). Molecular and Biochemical analysis of the estrogenic and proliferative properties of vitamin E compounds. *Frontiers in Oncology*, 5, 287.
- Kopustinskiene, D.M., Jakstas, V., Savickas, A., Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*, 12, 457.
- Li, Y., Ouyang, S., Tu, L., Wang, X., Yuan, W., Wang, G., Wu, Y., Duan, W., Yu, H., Fang, Z., Kurihara, H., Zhang, Y., He, R. (2018). Caffeine protects skin from oxidative stress-induced senescence through the activation of autophagy. *Theranostics*, 8, 5713–5730.
- Mahoney, C.E., Pirman, D., Chubukov, V., Sleger, T., Hayes, S., Fan, Z.P., Allen, E.L., Chen, Y., Huang, L., Liu, M., Zhang, Y., McDonald, G., Narayanaswamy, R., Choe, S., Chen, Y., Gross, S., Cianchetta, G., Padyana, A. K., Murray, S., Liu, W., Marks, K.M., Murtie, J., Dorsch, M., Jin, S., Nagaraja, N., Biller, S.A., Roddy, T., Popovici-Muller, J., Smolen, G.A. (2019). A chemical biology screen identifies a vulnerability of neuroendocrine cancer cells to SQLE inhibition. *Nature Communications*, 10, 96.
- Malig, T.C., Ashkin, M.R., Burman, A.L., Barday, M., Heyne B.J.M., Back, T.G. (2017). Comparison of free-radical inhibiting antioxidant properties of carvedilol and its phenolic metabolites. *MedChemComm*, 8, 606–615.
- Micera, M., Botto, A., Geddo, F., Antoniotti, S., Berteza, C.M., Levi, R., Gallo, M.P., Querio, G. (2020). Squalene: More than a step toward sterols. *Antioxidants*, 9, 688.
- Miyazawa, T., Burdeos, G.C., Itaya, M., Nakagawa, K., Miyazawa, T. (2019). Vitamin E: regulatory redox interactions. *IUBMB Life*, 71(4), 430–441.
- Moya-Camarena, S.Y., Jiang, Q. (2012). The role of vitamin E forms in cancer prevention and therapy—studies in human intervention trials and animal models. In: Sarkar, F., (eds) *Nutraceuticals and cancer*. Springer, Dordrecht, 323–354.
- Ozsoy, N., Candoken, E., Akev, N. (2009). Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in Aloe vera. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 99–106.
- Park, J., Matralis, A.N., Berghuis, A.M., Tsantrizos, Y.S. (2014). Human isoprenoid synthase enzymes as therapeutic targets. *Frontiers in Chemistry*, 2, 50.
- Prasad, S., Gupta, S., Pandey, M., Tyagi, A., Deb L. (2016). *Oxidative Stress and Cancer: Advances and Challenges*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5010423.
- Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A.K. (2017). Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95–105.
- Pullar, J.M., Carr, A.C., Vissers, M. (2017). The Roles of Vitamin C in skin health. *Nutrients*, 9, 866.
- Qin, Y., Zhang, Y., Tang, Q., Jin, L., Chen, Y. (2017). SQLE induces epithelial-to-mesenchymal transition by regulating of miR-133b in esophageal Squamous cell carcinoma. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 49, 138–148.
- Ramírez-Torres, A., Gabás, C., Barranquero, C. (2011). *Squalene: current knowledge and potential therapeutical uses (Biotechnology in agriculture, industry and medicine)*. Nova Science Publishers Incorporated, 73p.
- Romanet, R., Coelho, C., Liu, Y., Bahut, F., Ballester, J., Nikolantonaki, M., Gougeon, R.D. (2019). The antioxidant potential of white wines relies on the chemistry of sulfur-containing compounds: an optimized DPPH Assay. *Molecules*, 24, 1353.
- Sánchez-Valle, V., Méndez-Sánchez, N. (2018). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Médica Sur*, 20(3), 161–168.
- Sánchez-Valdeolivar, C.A., Alvarez-Fitz, P., Zacapala-Gómez, A.E., Acevedo-Quiroz, M., Cayetano-Salazar, L., Olea-Flores M., Castillo-

- Reyes, J.U., Navarro-Tito, N., Ortuño-Pineda, C., Leyva-Vázquez, M.A., Ortíz-Ortíz, J., Castro-Coronel, Y., Mendoza-Catalán, M.A. (2020). Phytochemical profile and antiproliferative effect of *Ficus crocata* extracts on triple-negative breast cancer cells. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20, 191.
- Shimizu, N., Ito, J., Kato, S., Eitsuka, T., Saito, T., Nishida, H., Miyazawa, T., Nakagawa, K. (2019). Evaluation of Squalene oxidation mechanisms in human skin surface lipids and shark liver oil supplements. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1457, 158-165.
- Sies, H. (2018). On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 122–126.
- Silva, G.A.F., Nunes, R.A.L., Morale, M.G., Boccardo, E., Aguayo, F., Termini L. (2018). Oxidative stress: therapeutic approaches for cervical cancer treatment. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 73(suppl 1), e548s.
- Sylvester, P.W., Akl, M.R., Malaviya, A., Parajuli, P., Ananthula, S., Tiwari, R.V., Ayoub, N.M. (2014). Potential role of tocotrienols in the treatment and prevention of breast cancer. *BioFactors*, 40, 49–58.
- Termini, L., Fregnani, J.H., Boccardo, E., da Costa, W.H., Longatto-Filho, A., Andreoli, M. A., Costa, M.C., Lopes, A., da Cunha, I.W., Soares, F.A., Villa, L.L., Guimarães, G.C. (2015). SOD2 immunexpression predicts lymph node metastasis in penile cancer. *BMC Clinical Pathology*, 15, 3.
- Wang, L., Wang, C., Tao, Z., Zhao, L., Zhu, Z., Wu, W., He, Y., Chen, H., Zheng, B., Huang, X., Yu, Y., Yang, L., Liang, G., Cui, R., Chen, T. (2019). Curcumin derivative WZ35 inhibits tumor cell growth via ROS-YAP-JNK signaling pathway in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 460.
- Yan, X., Zhang, G., Bie, F., Lv, Y., Ma, Y., Ma, M., Wang, Y., Hao, X., Yuan, N., Jiang, X. (2017). Eugenol inhibits oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation via downregulation of c-Myc/PGC-1 $\beta$ /ERR $\alpha$  signaling pathway in MCF10A-ras cells. *Scientific Reports*, 7, 12920.
- Yoon, Y., Lee, Y.M., Song, S., Lee, Y.Y., Yeum, K.J. (2018). Black soybeans protect human keratinocytes from oxidative stress-induced cell death. *Food Science and Nutrition*, 6, 2423-2430.
- Zhu, Y., Yao, Y., Shi, Z., Everaert, N., Ren, G. (2018). Synergistic effect of bioactive anticarcinogens from soybean on anti-proliferative activity in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. *Molecules*, 23, 1557.
- Zingg, J. M. (2019). Vitamin E: regulatory role on signal transduction. *IUBMB Life*, 71(4), 456–478.
- Zulkapli, R., Abdul-Razak, F., Zain R.B. (2017). Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) exhibits antitumour activity on oral squamous carcinoma cells ORL-48. *Integrative Cancer Therapies*, 16, 414-425.