



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA PARA EL
DESARROLLO DE ANTINEOPLÁSICOS Y
ANTIFÚNGICOS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VITRO* DE CATIONES
LIPOFÍLICOS DE ÁCIDO CAFEICO MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE
DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS**

Javiera Alejandra Tamarin Zapata

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO - DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. José Antonio Jara S. Ph.D. Q.F.

Adscrito a Proyecto Fondecyt Iniciación N° 11180533

Santiago - Chile

2023



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA PARA EL
DESARROLLO DE ANTINEOPLÁSICOS Y
ANTIFÚNGICOS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL *IN VITRO* DE CATIONES
LIPOFÍLICOS DE ÁCIDO CAFEICO MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE
DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS**

Javiera Alejandra Tamarin Zapata

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO - DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. José Antonio Jara S.Ph.D. Q.F.

Adscrito a Proyecto Fondecyt Iniciación N° 11180533

Santiago - Chile

2022

So young at heart

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a fondecyt iniciación N° 11180533.

Quisiera partir agradeciendo al laboratorio por la paciencia y el apoyo brindado tanto de mi tutor Dr José Jara, como del Dr Alfredo Molina. Menciono al laboratorio para hacer referencia a las personas que formaron parte, decir que fue una linda experiencia que llevaré conmigo y que no hubiese sido igual sin ustedes.

También quiero agradecer a todos quienes estuvieron durante esta etapa universitaria, me siento infinitamente feliz y honrada por todas las personas a las que puedo llamar amigos y pololo.

A mi familia por estar conmigo y apoyarme en todo, no lo habría logrado sin su apoyo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	i
RESUMEN	iv
INTRODUCCIÓN	1
Cáncer y Epidemiología	1
Generalidades del Cáncer Oral	2
Factores de riesgo de cáncer oral y desórdenes orales potencialmente malignos	3
Tratamiento del Carcinoma Oral de Células Escamosas	5
Heterogeneidad Intratumoral	6
Mitocondria y fosforilación oxidativa	8
Mitocondria en Células Tumorales	11
Moléculas dirigidas a las mitocondrias: Trifenilfosfonio	11
Polifenoles como alternativa de tratamiento: Ácido cafeico	13
Ácido cafeico unido a Trifenilfosfonio	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
Hipótesis	17
Objetivos	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
<u>Materiales</u>	
a) Compuestos	19

b) Reactivos	19
c) Líneas Celulares	20
 <u>Métodos</u>	
a. Cultivos Celulares	20
b. Ensayo de Viabilidad Celular MTT	21
c. Determinación de los Niveles de ATP intracelular	23
d. Medición del Consumo de Oxígeno	24
e. Análisis estadístico	26
RESULTADOS	28
1. Ensayo de viabilidad celular	28
1.1 LÍNEA CELULAR CAL 27.....	28
1.2 LÍNEA CELULAR OECM 1.....	31
1.3 LÍNEA CELULAR DE FIBROBLASTOS.....	34
2. Evaluación del contenido de adenosín trifosfato	37
1.1 LÍNEA CELULAR CAL 27.....	38
1.2 LÍNEA CELULAR OECM 1.....	44
3. Medición del consumo de oxígeno	49
1.1 LÍNEA CELULAR OECM 1.....	50
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	77

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de tablas		Página
Tabla 1	Caracterización de las líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas utilizadas, según su ficha técnica.....	20
Tabla 2	Concentraciones finales de los compuestos utilizados para realizar curvas dosis-respuesta en ensayos de viabilidad celular..	22
Tabla 3	Concentraciones de IC ₅₀ en CAL 27 obtenidas a partir de ensayo colorimétrico MTT.	29
Tabla 4	Concentraciones de IC ₅₀ de OEEM 1 obtenidas a partir de ensayo colorimétrico MTT.....	33
Tabla 5	Concentraciones de IC ₅₀ de fibroblastos obtenidas a partir de ensayo colorimétrico MTT.....	35
Tabla 6	Índice de selectividad de los cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico a 48 horas de tratamiento.....	37
Tabla 7	Valores de IC ₅₀ obtenidos por Li, J. y cols en líneas celulares de hepatocarcinoma y células hepáticas con ácido cafeico y MitoCaA.....	57

Índice de figuras		Página
Figura 1	Representación esquemática de aspectos histológicos del microambiente en carcinoma oral de células escamosas.....	7
Figura 2	Cadena transportadora de electrones y ATP sintetasa: esquema de la fosforilación oxidativa.....	9
Figura 3	Estructura química del Trifenilfosfonio.....	12
Figura 4	Captación celular de compuestos enlazados con TPP + impulsada por los potenciales de la membrana plasmática y la membrana mitocondrial.....	13
Figura 5	Estructura química del fenetil éster de ácido cafeico.....	13
Figura 6	Estructura química del ácido cafeico.....	14

Figura 7	Estructura química de los cationes lipofílicos de ácido cafeico unidos a cuatro largos de cadena alifática. a) CA-TPP ⁺ C ₈ b) CA-TPP ⁺ C ₁₀ c) CA-TPP ⁺ C ₁₁ d) CA-TPP ⁺ C ₁₂	16
Figura 8	Representación esquemática del mecanismo de acción postulado en la hipótesis de trabajo.....	17
Figura 9	Esquema del manejo con tripsina en las líneas celulares <i>in vitro</i> .	21
Figura 10	Esquema del procedimiento para el ensayo de viabilidad celular con MTT.....	23
Figura 11	Esquema del procedimiento para el ensayo de medición del contenido de ATP.....	24
Figura 12	Esquema de los componentes del oxígrafo.....	25
Figura 13	Viabilidad celular en CAL 27 posterior a 48 de tratamiento con a) CA-TPP ⁺ C ₈ b) CA-TPP ⁺ C ₁₀ c) CA-TPP ⁺ C ₁₁ d) CA-TPP ⁺ C ₁₂	29
Figura 14	Comparación estadística de los valores de IC ₅₀ en CAL 27.....	30
Figura 15	Viabilidad celular en CAL 27 posterior a 48 de tratamiento con Ácido Cafeico.....	31
Figura 16	Viabilidad celular en OECM 1 posterior a 48 de tratamiento con a) CA-TPP ⁺ C ₈ b) CA-TPP ⁺ C ₁₀ c) CA-TPP ⁺ C ₁₁ d) CA-TPP ⁺ C ₁₂	32
Figura 17	Viabilidad celular en OECM 1 posterior a 48 de tratamiento con Ácido Cafeico.....	33
Figura 18	Comparación estadística de los valores de IC ₅₀ entre las dos líneas celulares tumorales orales.....	34
Figura 19	Viabilidad celular en fibroblastos posterior a 48 de tratamiento con a) CA-TPP ⁺ C ₈ b) CA-TPP ⁺ C ₁₀ c) CA-TPP ⁺ C ₁₁ d) CA-TPP ⁺ C ₁₂	35
Figura 20	Viabilidad celular en fibroblastos posterior a 48 de tratamiento con Ácido Cafeico.....	36
Figura 21	a) Contenido de ATP intracelular y viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₈ . b) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.....	39
Figura 22	a) Contenido de ATP intracelular y viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₁₀ . b) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.....	40
Figura 23	a) Contenido de ATP intracelular y viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₁₁ . b) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.....	42

Figura 24	a) Contenido de ATP intracelular y viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₁₂ . b) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.....	43
Figura 25	a) Contenido de ATP intracelular y viabilidad celular, ambos en OEEM 1 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₈ . b) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.....	45
Figura 26	a) Contenido de ATP intracelular y viabilidad celular, ambos en OEEM 1 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₁₀ . b) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.....	46
Figura 27	a) Contenido de ATP intracelular y viabilidad celular, ambos en OEEM 1 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₁₁ . b) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.....	47
Figura 28	a) Contenido de ATP intracelular y viabilidad celular, ambos en OEEM 1 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₁₂ . b) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.....	48
Figura 29	Gráfico representativo de la pendiente de la velocidad de consumo de oxígeno obtenida con OEEM 1 tras el tratamiento con CA-TPP ⁺ C ₈	50
Figura 30	Relación de consumo de oxígeno en OEEM 1 luego del tratamiento CA-TPP ⁺ C ₈ con respecto al control negativo.....	51
Figura 31	Relación de consumo de oxígeno en OEEM 1 luego del tratamiento CA-TPP ⁺ C ₁₀ con respecto al control negativo.....	51
Figura 32	Relación de consumo de oxígeno en OEEM 1 luego del tratamiento CA-TPP ⁺ C ₁₁ con respecto al control negativo.....	52
Figura 33	Relación de consumo de oxígeno en OEEM 1 luego del tratamiento CA-TPP ⁺ C ₁₂ con respecto al control negativo.....	53
Figura 34	Comparación de las estructuras químicas entre el a) ácido gálico y b) ácido cafeico.....	55
Figura 35	Estructuras químicas MitoHCA de Li, J., y cols.....	57
Figura 36	Comparación de las estructuras químicas entre el a) compuesto 1 y b) CA-TPP ⁺ C ₈	60

RESUMEN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es un tumor sólido que se caracteriza por presentar una diferencia de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) con mayor electronegatividad que cualquier otra célula o tejido de diferentes órganos, característica que nos permite dirigir selectivamente moléculas hacia ellas. Por otro lado, los tratamientos actuales no son selectivos y dificultan la rehabilitación posterior, es por ello la búsqueda de nuevos tratamientos. En ese contexto el ácido cafeico es un compuesto fenólico, que su forma esterificada ha demostrado actividad antineoplásica. Dada la diferencia de potencial de membrana del COCE, es que postulamos que el ácido cafeico unido al Trifenilfosfonio da origen a un catión lipofílico (CA-TPP⁺) que tiene actividad citotóxica e interfiere con la función mitocondrial. Metodología: Se evaluó el efecto citotóxico con dos líneas celulares de COCE (CAL 27 y OECM 1) y en fibroblastos orales, mediante el ensayo de viabilidad celular MTT a las 48 horas de tratamiento, utilizando cuatro moléculas con distintos largos de cadena alifática (8, 10, 11 y 12). Posteriormente, se estudió la función mitocondrial, determinando los niveles de adenosín trifosfato (ATP) en CAL 27 y OE CM1, y el consumo de oxígeno en OECM 1. Resultados: CA-TPP⁺ tuvo efecto citotóxico en ambas líneas celulares de COCE, con valores de IC₅₀ entre [0,5 a 15 μ M] y en fibroblastos [9,8-14,6 μ M]. El compuesto con menor selectividad en conjunto fue CA-TPP⁺C₁₀. Respecto a los niveles de ATP ninguno de los cuatro cationes lipofílicos de ácido cafeico mostró una variación estadísticamente significativa luego del tratamiento. En OECM 1 se observó un aumento de la velocidad del consumo de oxígeno inmediatamente tras el tratamiento con los cuatro compuestos en un rango de 129% a 237%; sin embargo, sólo en CA-TPP⁺C₁₂ se observa una relación concentración dependiente en el aumento. Conclusiones: Los cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico tiene efecto citotóxico e intervienen en la función mitocondrial *in vitro* en carcinoma oral de células escamosas. No obstante, son necesarios más estudios para precisar el efecto que producen a nivel mitocondrial.

INTRODUCCIÓN

Cáncer y Epidemiología

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal de las células y puede surgir en cualquier órgano o tejido. Estas células se caracterizan por presentar resistencia a la apoptosis (Burke, P.J., 2017) y un pobre reconocimiento por parte del sistema inmunitario hacia estas células (Yin, W. y cols, 2021).

Los factores de riesgo asociados al cáncer están en íntima relación con el estilo de vida actual como lo son la exposición a radiación UV, el uso de tabaco, el alcohol, el sobrepeso y obesidad (IMC elevado), la alimentación no saludable e infecciones, entre otros (Lewandowska, A. M. y cols, 2019; Santander, S. y cols, 2022).

El año 2020 la incidencia mundial de cáncer fue 20,44% al cual se le atribuyen 9.958.133 muertes (GLOBOCAN, 2020). En Chile, en el año 2019 el cáncer se posicionó como la primera causa de muerte en diez regiones: Arica y Parinacota, Tarapacá, Antofagasta, Atacama, Coquimbo, Bio-bío, La Araucanía, Los Ríos, Los Lagos y Aysén (Santander, S. y cols, 2022). Recientemente, producto de la pandemia ocasionada por SARS-CoV-2, las atenciones de salud por morbilidad de enfermedades crónicas no transmisibles disminuyeron. Centrándonos en concreto en el cáncer, la disminución de las atenciones en Chile fue de un 55% a 64%, las que van desde prestaciones ambulatorias oncológicas semanales, hasta el diagnóstico y seguimiento del cáncer (Santander, S. y cols, 2022). Es por ello, que como resultado del retraso diagnóstico se ha descrito un aumento en la distribución de cánceres detectados en etapas más tardías en los años 2020-2022 comparado con un escenario sin COVID-19, de ahí que surge la necesidad de complementar el Plan Nacional de Cáncer 2018-2028 en marzo de 2022 con el Plan Nacional de Cáncer 2022-2027. Relativo al impacto económico del año 2017 al año 2021 el presupuesto anual para el tratamiento de cáncer aumentó de 117.110.982 a 349.125.000 exhibiendo un incremento del 198% en 4 años (Santander, S. y cols, 2022).

Generalidades del Cáncer Oral

Dentro de los tejidos y órganos en que se puede desarrollar cáncer está la cavidad oral, estructura inseparable e integrante de funciones como la respiración, habla, deglución, gusto, masticación, movimientos mandibulares y estética facial (Zenga, J. y Harris, M.S., 2021) además de ser un componente psicológico importante (Cerea, S. y cols, 2022). Es a causa de su ubicación, la alta carga de enfermedad y consecuencias post tratamiento, que los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, incluido el cáncer oral tienen una mayor tasa de suicidio a pesar de haber recibido un tratamiento oncológico óptimo (Osazuwa-Peters, N. y cols, 2018; Friedland, C. J., 2019). El cáncer de cabeza y cuello viene acompañado de problemas psicosociales, como conflictos interpersonales, aislamiento social, una imagen alterada de sí y angustia sobre la imagen corporal (Smith, J. D. y cols, 2017; Osazuwa-Peters, N. y cols, 2018; Cerea, S. y cols, 2022).

El cáncer de cavidad oral y labios es el décimo sexto cáncer más frecuente a nivel mundial con una incidencia de 377.713 (4,8 por cada 100.000 habitantes), Chile según la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, está ubicado en el lugar vigésimo tercero, con una incidencia de 1,5 por cada 100.000 habitantes (GLOBOCAN, 2020). Respecto al perfil de pacientes con cáncer oral en Chile los estudios coinciden en que este es diagnosticado en la mayoría de los casos después de la cuarta década de vida, con mayor prevalencia en hombres, donde el sitio de desarrollo más prevalente es la lengua (Maraboli-Contreras, S. y cols, 2018; Bórquez, P. y cols, 2011; Pennacchiotti, G., y cols, 2016; Ramirez, V. y cols, 2015; Candía, J. y cols, 2018), presentando una sobrevida de estos pacientes el promedio de 45% a los 5 años (Maraboli-Contreras, S. y cols, 2018; Bórquez, P. y cols, 2011), con una mortalidad fluctuante de 0,9-1,3 por cada 100.000 habitantes (Morales, A. y cols, 2020).

La cavidad oral, es el espacio anatómico comprendido entre el labio mucoso hasta la unión del paladar blando con el paladar duro (Howard, A., y cols, 2021; Wong, T. y Wiesenfeld, D., 2018). Se han definido siete ubicaciones para clasificar el cáncer que son labio, dos tercios anteriores de la lengua, piso de boca,

mucosa bucal, paladar duro, mucosa alveolar, trigono retromolar y paladar blando (Wong, T. y Wiesenfeld, D., 2018; Howard, A. y cols, 2021; Farthing, P. M. y Speight, P. M., 2018). El tipo de cáncer más frecuente en la cavidad oral es COCE, se ha descrito que se presenta de un 90 a 95% de los casos (Vitório, J.G. y cols, 2020; Ganesh, D. y cols 2018; El-Naggar, A. K. y cols, 2017), siendo definido por la Organización Mundial de Salud como un carcinoma con diferenciación escamosa que surge del epitelio de la mucosa (El-Naggar, A. K. y cols, 2017).

La detección de cáncer oral se realiza mediante inspección visual y palpación, seguido de una biopsia y examen histopatológico (El-Naggar, A. K. y cols, 2017); esto es, que se requiere de una biopsia para la confirmación diagnóstica. Dado que el cribado se realiza mediante inspección visual es fundamental educar a los pacientes y personal de salud respecto del autoexamen oral (Farthing, P. M. y Speight, P. M., 2018), advirtiéndoles que se debe sospechar cuando identifiquen lesiones en boca que persistan por más de tres semanas, principalmente úlceras que no sanen entre siete y veintiún días (García Moreno, M. E. y cols, 2021).

Factores de Riesgo de Cáncer Oral y Desórdenes Orales Potencialmente Malignos

Respecto a los factores de riesgo asociados a hábitos identificados para el desarrollo de cáncer oral se describe el consumo de tabaco en cualquiera de sus presentaciones. El hábito de fumar cigarrillos de cualquier modo es determinante en relación al desarrollo de cáncer oral, la frecuencia, duración y el haber consumido alguna vez (Lewandowska, A. M. y cols, 2019; Hashibe, M. y cols 2007; Chamoli, A. y cols, 2021). El consumo de alcohol, por su parte tiene un efecto tanto independiente frente a un consumo excesivo (Bugshan, A. y Farooq, I., 2020), como sinérgico junto al tabaco (Johnson, D. E. y cols, 2020) al permeabilizar el epitelio oral, disolver el tabaco y promover su penetración (Lewandowska, A. M. y cols, 2019).

Por otra parte, el virus del papiloma humano (VPH) se ha vinculado al surgimiento de tumores con previa infección por cepas oncogénicas como el VPH-16 y el VPH-18 principalmente (Kouketsu, A. y cols, 2016). Los carcinomas de cabeza y cuello (HNSCC, *Head and neck squamous cell carcinoma*) positivos a VPH tienen un pronóstico más favorable; se estima que puede deberse a que los HNSCC positivos a VPH tienen una expresión génica, perfiles mutacionales e inmunitarios con diferencias distintivas de los HNSCC negativos a VPH (Johnson, D. E. y cols, 2020). En Chile con el fin de prevenir los cánceres derivados del VPH se incorporó en el Plan Nacional de Inmunización el año 2014 la vacuna recombinante contra el virus del papiloma humano con su primera dosis en cuarto básico y la segunda en quinto básico (MINSAL, 2018), que incluye protección contra los tipos 6, 11, 16 y 18 (Folleto de Información al profesional Gardasil 9 Vacuna Nonavalente Antivirus Papiloma Humano Recombinante Adsorbida).

En la mayoría de los casos, el cáncer se desarrolla desde un desorden oral potencialmente maligno (DOPM). Clínicamente tienen una gran variedad de presentaciones que se manifiestan en cambios en el color, topografía y tamaño (Speight, P. M., y Farthing, P. M., 2018; Warnakulasuriya, S. y cols 2021), como por ejemplo leucoplasia, eritroplasia, entre otros (anexo 1) (Ganesh, D. y cols, 2018); o en su minoría, también pueden surgir *de novo*. En ambos sucesos, se cree que la exposición crónica a carcinógenos es el principal factor de riesgo (Kerawala, C. y cols, 2016).

Los DOPM son definidos como “cualquier anomalía de la mucosa oral que se asocia con un riesgo estadísticamente mayor de desarrollo de cáncer” (Warnakulasuriya, S. y cols 2021). Si bien, los pacientes que presentan DOPM tienen un mayor riesgo de cáncer de labio o de cavidad oral, sólo una minoría progresa a cáncer (Warnakulasuriya, S. y cols 2021). Por lo tanto, la propensión a la progresión maligna de estas lesiones es difícil de predecir (Ojeda, D. y cols, 2020). El desarrollo de cáncer no ocurre necesariamente en el sitio donde se observa la mucosa visiblemente alterada, un DOPM sólo nos indica que existe un campo de anormalidad con mayor riesgo que la mucosa clínicamente normal (Warnakulasuriya, S. y cols 2021), pero no es predictor, por lo que el paciente con

un DOMP tiene riesgo en general para cualquier sitio de la cavidad oral. En consecuencia, para la historia de la enfermedad tanto de COCE como de DOPM se pueden establecer cuatro escenarios: COCE agresivos, COCE menos agresivos, COCE indolentes y DOMP no progresivos (anexo 2) (Warnakulasuriya, S. y Kerr, A. R., 2021).

Tratamiento del Carcinoma Oral de Células Escamosas

El tratamiento de elección para el cáncer oral es la resección quirúrgica. En estadios tempranos se recomienda por sí sola, en estadios tardíos con radioterapia (RT) o quimiorradioterapia (QRT) adyuvante, y en el caso de pacientes con tumores no resecables, o de lo contrario, con tumores resecables, pero donde el resultado esperado y el pronóstico es tan malo que no justifican una cirugía mutiladora, es recomendable la QRT (Machiels, J.P. y cols, 2020). Los tratamientos adyuvantes se indican cuando el paciente se encuentra en un estadio locorregional avanzado o con alto riesgo de recurrencia, lo que se debe a que el uso concomitante de QRT ha dado como resultado un mayor control locorregional y una mejor supervivencia global en comparación con la RT por sí sola (Machiels, J.P. y cols, 2020).

En lo que respecta al momento del diagnóstico, y, por tanto, a la elección del tratamiento del COCE, la baja supervivencia nos evidencia que suele ocurrir un diagnóstico tardío de este o bien que se presenta con un carácter agresivo (Maraboli-Contreras, S. y cols, 2018). En consecuencia, es habitual la indicación de QRT concomitante (Machiels, J.P. y cols, 2020).

De cara al acceso a tratamiento en Chile, el cáncer oral no está incluido dentro de los diecisiete tipos de cánceres y/o patologías asociadas abarcados por las Garantías Explícitas de Salud (GES). Aun cuando, entre las características de la gestión en la red pública oncológica se encuentra facilitar el acceso y oportunidad a la atención integral, dada la complejidad del tratamiento, el paciente requerirá de una atención multidisciplinaria que involucre cirujanos de cabeza y

cuello, médicos oncólogos, radioterapeutas, otorrinos, fonoaudiólogos, cirujanos maxilofaciales, rehabilitadores orales y/o somatoprotesistas y patólogos orales, además del servicio y equipamiento necesario, atenciones que sólo se prestan en servicios de alta complejidad, en particular la cirugía. En cuanto a la terapia coadyuvante, actualmente siete establecimientos entregan servicio de radioterapia, y veintiséis establecimientos entregan prestaciones de terapia sistémica (quimioterapia) con aproximadamente 300 unidades persona/sillón para su aplicación distribuidos al largo del país (anexo 3) (Santander, S. y cols, 2022).

Con todo, una gran proporción de pacientes experimenta metástasis cervical y recurrencia a largo plazo, fundamentalmente en los tumores diagnosticados en etapa tardía, lo cual hace necesaria la investigación para el acabado conocimiento del COCE (Yin, W. y cols, 2021; Noh, J. K. y cols, 2023), siendo la comprensión incompleta de las células iniciadoras de tumores y su nicho, junto a la heterogeneidad intratumoral una importante barrera para mejorar la eficacia terapéutica (Oshimori, N., 2020; Thomson, P. J., 2018; Noh, J. K. y cols, 2023).

Heterogeneidad Intratumoral

Una característica distintiva del COCE es la heterogeneidad intratumoral (Vitório, J.G. y cols, 2020), con ella aludimos a las distintas poblaciones de células tumorales que tienen diferentes perfiles moleculares y fenotípicos dentro de la misma muestra tumoral (fig. 1) (Ramón Y Cajal, S. y cols, 2020; Jamal-Hanjani, M. y cols, 2015; Gabusi, A. y cols, 2020), y que pueden ser fácilmente detectadas al tomar muestras de múltiples regiones tumorales (Gabusi, A. y cols, 2018; Mroz, E. A. y cols, 2015; Mroz, E. A. y cols, 2020). Se asocia a mal pronóstico en cuanto a supervivencia, metástasis y recurrencia posterior al tratamiento.

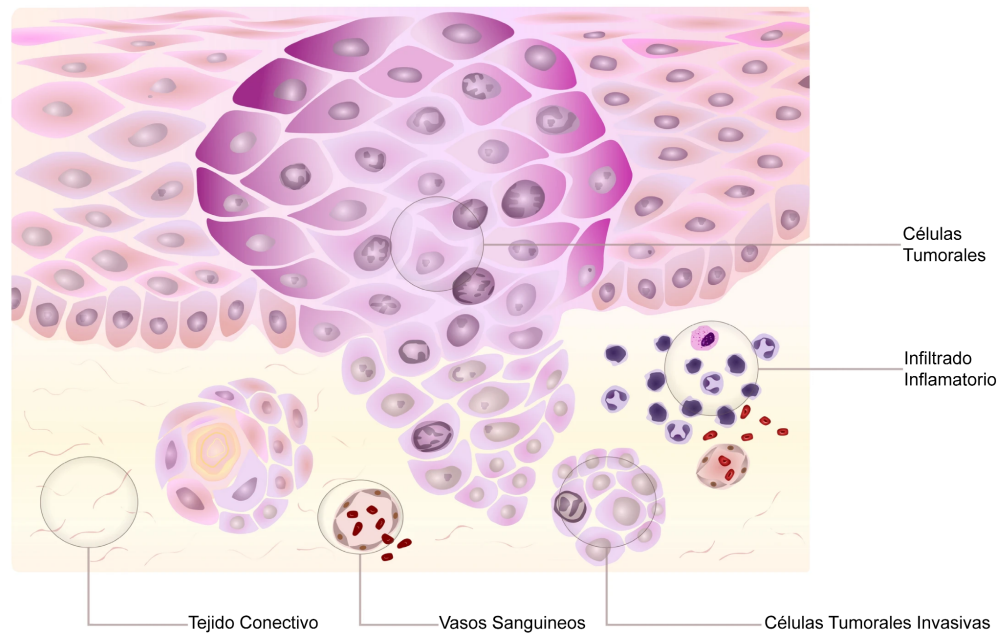


Figura 1: Representación esquemática de aspectos histológicos del microambiente del COCE.

El microambiente de COCE comprende distintas poblaciones de células estromales y tumorales, matriz extracelular y varias moléculas de señalización. Entre las células neoplásicas se observan distintas poblaciones celulares con distintos perfiles genéticos. Estos clones pueden presentar diferentes características fenotípicas, incluidas distintas capacidades para invadir tejidos adyacentes y hacer metástasis, e incluso mostrar diferencias en su perfil metabólico. Imagen adaptada de Vitório, J. G. y cols. (2020). Metabolic landscape of oral squamous cell carcinoma.

Es en el marco de la heterogeneidad intratumoral que se han identificado fenotipos metabólicos variados dentro del tumor, lo que se conoce como heterogeneidad metabólica. En contexto a ello, históricamente se ha sostenido que la reprogramación metabólica que presentan las células cancerosas la constituye una regulación al alza en la vía de la glicólisis (fosforilación a nivel de sustrato), tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, para la obtención de energía en forma de adenosín trifosfato (ATP), con una regulación a la baja de la de la fosforilación oxidativa (OXPHOS, *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System*), rasgo metabólico conocido como "efecto Warburg" y que se planteó como un sello distintivo del cáncer (Vaupel, P. y cols, 2019). Asimismo, se estima que la glicólisis favorece el crecimiento del tumor, puesto que la velocidad de formación de ATP por el proceso glucolítico es más rápida que la formación de ATP a través del metabolismo oxidativo, ya que este último implica una serie de reacciones químicas complejas que involucran al ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Clark, J.W. y Longo D.L., 2022)

No obstante, varias investigaciones dan cuenta que la OXPHOS al ser un proceso mucho más eficiente para generar ATP destinado a la utilización de energía: 30-32 moléculas de ATP por molécula de glucosa con OXPHOS versus 1-2 moléculas de ATP por molécula de glucosa con la glicólisis (Levitzy, M. y McDonough, K.H., 2013), ocurre.

En un estudio realizado por Noh, J. K. y cols, 2023 halló que los genes de OXPHOS en COCE se han asociado a un pobre pronóstico de la enfermedad (Noh, J. K. y cols, 2023).

Mitocondria y Fosforilación Oxidativa

La fosforilación oxidativa es la forma regular de obtención de energía de las células no tumorales, puesto que, resulta más eficiente energéticamente. La OXPHOS se realiza en la mitocondria, organelo que tiene dos membranas; la membrana mitocondrial externa (MME) que es permeable a moléculas pequeñas e iones, los que se mueven libremente a través de los canales transmembrana llamados porinas; y la membrana interna (MMI) que es impermeable a la mayoría de moléculas e iones, incluido a protones (H^+). Las especies que cruzan esta membrana lo hacen a través de transportadores específicos, y es en ella donde se encuentran los componentes de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa. El espacio interior de la membrana interna se denomina matriz mitocondrial, es en ella donde ocurre entre otros procesos el ciclo del ácido cítrico y la OXPHOS (Iwasa J, y Marshall W(Eds.), 2020). La glicólisis que ocurre en el citoplasma (Nelson, D.L. y cols, 2015).

La OXPHOS inicia con la entrada de los electrones entregados por las coenzimas de oxidación reducción ($NADH$ y $FADH_2$) a la cadena de transportadores electrónicos denominada cadena respiratoria (Nelson, D.L. y cols, 2015). Dicha cadena está compuesta por cuatro complejos proteínicos, donde los electrones, en términos generales, transcurren guiados por el mayor potencial de reducción de

cada complejo (ordenados según afinidad electrónica creciente), desde el complejo I: *NADH-Q oxidoreductasa* o complejo II: *succinato-Q reductasa* dependiendo del transportador electrónico, y esta transferencia de electrones a la coenzima Q; luego el complejo III: *citocromo C oxidoreductasa* cataliza la transferencia de electrones desde la Coenzima Q reducida al citocromo C, y así finalmente el complejo IV: *citocromo C oxidasa*, quien reduce al O_2 , que es el aceptor final de electrones, generando dos moléculas de H_2O (fig. 2) (Botham, K.M., y Mayes, P.A., 2022). El O_2 mantiene una fuerte unión con el complejo IV hasta que se reduce por completo, lo que minimiza la liberación de intermediarios potencialmente dañinos como el anión superóxido y peróxido, que se forman cuando el O_2 acepta uno o dos electrones (Botham, K.M. y Mayes P.A., 2022).

El flujo de los electrones permite el bombeo de protones por parte de los complejos desde la matriz mitocondrial hacia el exterior, lo que genera una diferencia de potencial electroquímico de -150 milivolt (mV) (negativo al lado de la matriz mitocondrial), conocido como fuerza protón motriz o potencial quimiosmótico. Análogamente, el pH dentro de la matriz es cercano a 8, y el del espacio intermembrana es aproximadamente 7,4 (McKee, T. y McKee, J.R., 2020).

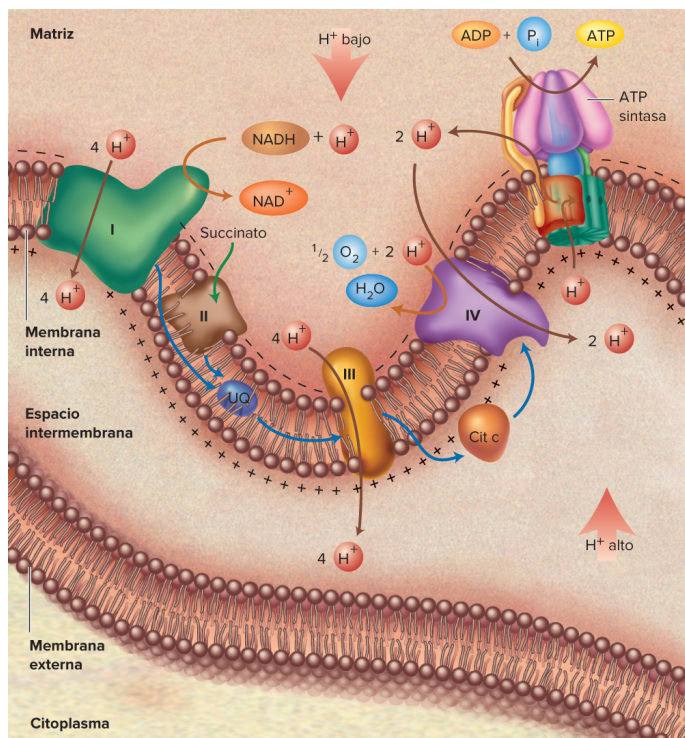


Figura 2: Cadena transportadora de electrones y ATP sintasa: esquema de la fosforilación oxidativa. Imagen tomada de McKee T, McKee JR. *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*, 7e; 2020, capítulo 10.

La energía liberada por el transporte de electrones genera un gradiente electroquímico a través de la membrana, es decir, los protones que están en exceso en el espacio intermembrana como consecuencia del funcionamiento de la cadena respiratoria, mediante su carga, concentración y baja permeabilidad en la MMI se acumulan e ingresan a través de la ATP sintasa. La ATP sintetasa es la enzima encargada de fosforilar a la adenosina difosfato (ADP,) y generar ATP; esta enzima está compuesta por dos complejos de proteínicos, que a su vez constan de subunidades: F_1 se proyecta hacia la matriz y contiene el mecanismo de fosforilación, y F_0 que abarca la MMI y forma un canal de protones, es el flujo termodinámicamente favorable de protones a través del canal de F_0 lo que impulsa la producción de ATP en el complejo F_1 (McKee, T., y McKee, J.R., 2020; Botham K.M. y Mayes P.A., 2022).

Por lo tanto, el funcionamiento de la cadena respiratoria y de la ATP sintasa se encuentra acoplado, es decir, una reacción no tiene lugar sin la otra; por ende los inhibidores de la cadena respiratoria bloquean el transporte de electrones (y el consumo de O_2) así como la síntesis de ATP, y viceversa (Nelson, D.L. y cols, 2015; McKee, T. y McKee, J.R., 2020).

Como subproducto del metabolismo oxidativo se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), las que actúan como moléculas de señalización fisiológica y patológica. Su nombre se debe a que el O_2 tiene la propiedad de aceptar 1 para formar derivados inestables (electrones que se escapan de los complejos proteínicos) como el anión superóxido (Iwasa J, & Marshall W(Eds.), (2020)

En células sanas la formación de ROS se mantiene al mínimo mediante antioxidantes y enzimas antioxidantes, ya que, reaccionan con los ROS antes de que estos dañen a las biomoléculas. Bajo ciertas condiciones denominadas como estrés oxidativo, los mecanismos antioxidantes se ven superados, por lo que los niveles de ROS aumentan y pueden dañar mecanismos celulares como provocar

inactivación enzimática, despolimerización de polisacáridos, ruptura del ADN y destrucción de la membrana (McKee, T. y McKee, J.R., 2020).

Otras funciones que posee la mitocondria es integrar vías metabólicas sintetizando los intermediarios necesarios para la síntesis celular, mantienen la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) y regulan la apoptosis, entre otro (Skorecki K.L., & Cohen B.H. 2022).

Mitocondria de Células Tumorales

La mitocondria de las células tumorales por su parte, poseen una diferencia de potencial de membrana $\Delta\Psi_m$ entre la matriz y el espacio intermembrana que aumenta aproximadamente -60 mV respecto de la mitocondria de una célula normal (Kim, G. G. y cols, 2020). Como resultado, la diferencia de potencial entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial de una célula tumoral resulta mayor que una mitocondria de célula no tumoral, y que cualquier otro organelo y célula de otro tejido no tumoral (Peredo-Silva, L. y cols, 2017). En efecto, el potencial de membrana negativo que existe al interior de la membrana mitocondrial interna provoca que los compuestos cargados positivamente se acumulen en la matriz mitocondrial contra su gradiente de concentración, a través de la fuerza electrostática (Zielonka, J. y cols, 2017).

Moléculas dirigidas a las mitocondrias: Trifenilfosfonio

La diferencia de potencial de transmembrana de las células tumorales nos permite utilizar cationes lipofílicos como el trifenilfosfonio (TPP^+) (fig. 3), el cual también es hidrofóbico y tiene baja reactividad. Esta molécula ha sido ampliamente utilizada para dirigir selectivamente compuestos (antioxidantes principalmente) hacia la mitocondria de células normales, donde destaca el MitoQ₁₀, Mito Vitamina C, y el MitoVit₂ (Wang, J.Y. y cols, 2020). TPP^+ también se ha utilizado en investigaciones para conducir grupos farmacóforos hacia la

mitocondria de células tumorales como el polifenol: ácido gálico, el que ha mostrado tener efecto sobre la función mitocondrial de células tumorales (Jara, J. A., y cols, 2014).

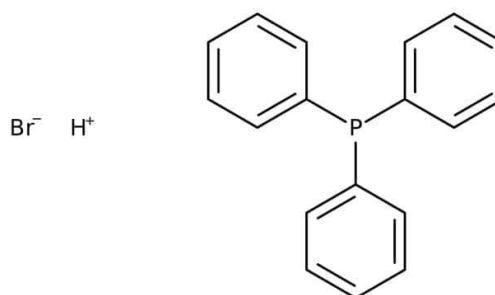


Figura 3: Estructura química del Trifenilfosfonio. Forma molecular C₁₈H₁₆BrP.

El fundamento de su uso es aprovechar el mayor potencial transmembrana mitocondrial que tienen las células cancerosas que sirve como fuerza impulsora para una mayor acumulación del grupo TPP⁺, puesto que tiene carga positiva (fig. 4) (Kalyanaraman, B., y cols, 2018) y es altamente liposoluble, lo que le permite difundir fácilmente a través de la bicapa lipídica de las membranas celulares, tanto plasmática como mitocondrial. (Sandoval-Acuña, C., y cols, 2016).

Se ha descrito que los compuestos cargados positivamente inhiben la respiración mitocondrial en células cancerosas (Kalyanaraman, B., y cols, 2018). El grupo TPP⁺ puede producir en algunos casos la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial, esta inhibición podría deberse a los grupos hidroxilos aromáticos de las moléculas, que al ser ácidos débiles se pueden comportar como agentes desacoplantes interfiriendo con el gradiente electroquímico producido por la diferencia de concentración de H⁺ entre la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana. De esta manera se produciría un mal funcionamiento de la fosforilación oxidativa que se traduce en una disminución de la síntesis de ATP (Sandoval-Acuña, C., y cols, 2016).

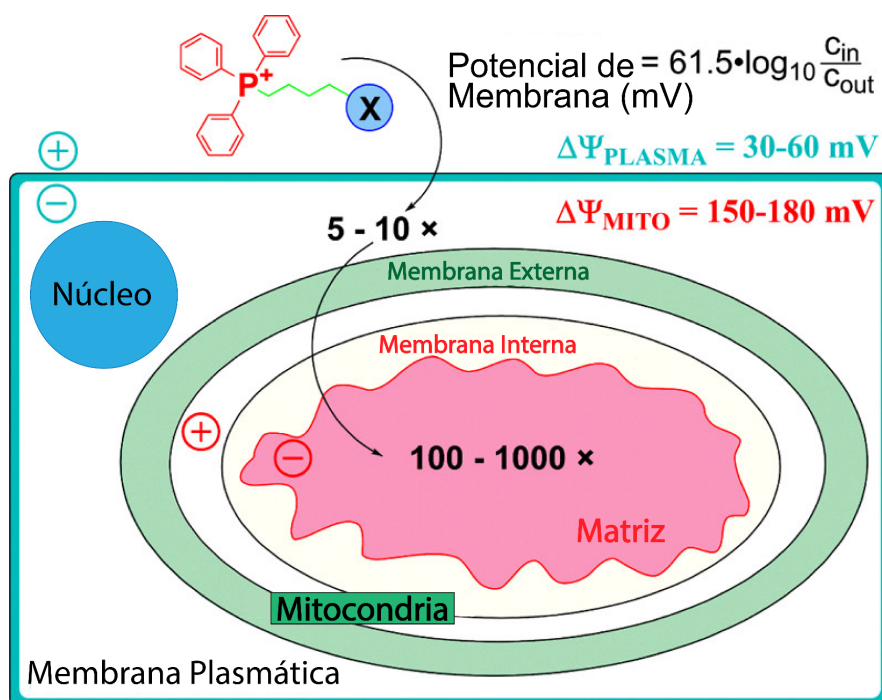


Figura 4: Captación celular de compuestos enlazados con TPP+ impulsada por los potenciales de la membrana plasmática y la membrana mitocondrial. Imagen adaptada de Zielonka, J., y cols. (2017). Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications.

Polifenoles como alternativa de tratamiento: ácido cafeico

Dentro de los polifenoles que han demostrado actividad antineoplásica resalta el fenetil éster de ácido cafeico (CAPE, *Caffeic Acid Phenethyl Ester*) (fig. 5). Varios estudios indican que suprime la proliferación, la supervivencia y la invasión de células cancerosas, evidenciando efectos en cáncer de próstata, cáncer de pulmón, hepatocarcinoma, glioblastoma, cáncer cérvico-uterino, entre otros (Mirzaei, S., y cols, 2021; Espíndola, K. M. M., y cols, 2019; Pelinson, L. P., y cols, 2019).

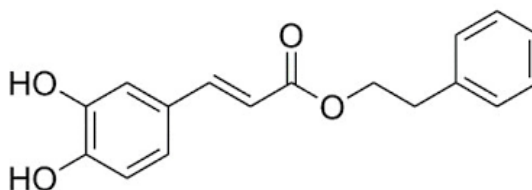


Figura 5: Estructura química del Fenetil Éster de Ácido Cafeico (CAPE). Fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_4$.

CAPE es derivado lipofílico esterificado del ácido cafeico, su alta lipofilicidad le permite atravesar membranas biológicas, donde la molécula con propiedades bioactivas es el ácido cafeico (Kuo, Y. Y y cols, 2015; Alam, M. y cols, 2022).

Al ácido cafeico (fig. 6) además de actividad antitumoral, se le han atribuido propiedades antibacterianas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, antiateroescleróticas, inmunoestimuladoras, antidiabéticas, cardioprotectoras, antiproliferativas y hepatoprotectora. Fue documentado por primera vez en 1935 como un compuesto derivado de las ciruelas, adjudicando su eficacia como laxante (Mrak, E., y cols, 1935). En 1980 se sugirió por primera vez su actividad como antineoplásico en un experimento realizado por Wattenberg y cols., donde indujo neoplasias a ratones. Entre los compuestos probados, el ácido cafeico fue uno de los que mostró actividad (Wattenberg, L. W., y cols, 1980); a partir de entonces, se han realizado varios estudios (Kuo, Y. Y y cols, 2013; Lee, Y. T y cols, 2005; Peng, C. Y y cols, 2012; Chung, L. C y cols, 2017; Yu, H. J. y cols, 2017) con el fin de determinar su bioactividad.

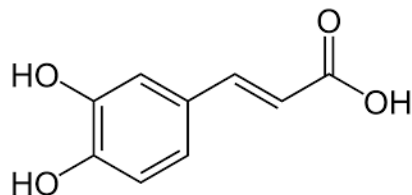


Figura 6: Estructura química del Ácido Cafeico (CA). Fórmula molecular $C_9H_8O_4$.

Ácido cafeico unido a Trifenilfosfonio

Como mencionamos anteriormente los efectos estudiados del ácido cafeico son en su forma esterificada como CAPE, el cual, si bien tiene la propiedad de ser lipofílico, no posee carga positiva como sí la tiene el TPP^+ , que es la que nos permitirá aprovechar la diferencia de potencial electronegativo de las mitocondrias de células tumorales.

Actualmente no hay trabajos experimentales publicados en COCE, sobre cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico, sin embargo, el año 2022 Bastidas H. y cols publicó una revisión en la que repasan la capacidad antitumoral y los mecanismos del ácido cafeico, donde se menciona la potencial utilidad de los derivados del ácido cafeico dirigidos a las mitocondrias mediante la unión química al catión lipofílico TPP⁺. Los autores proponen que los efectos citotóxicos que podrían tener estos derivados son perturbar a la carga negativa de la matriz mitocondrial ejercida por los cationes, y/o el grado en que los compuestos se intercalan en la MMI, lo cual puede variar dependiendo del largo de cadena alifática seleccionado para unir estas dos moléculas (Bastidas, H. y cols, 2022).

A mayor largo de cadena alifática se estima que los compuestos presentan mayor lipofilicidad, esto fomenta su intercalación en la MMI, lo que favorece su interacción con los complejos proteínicos de la cadena respiratoria. Por otro lado, a menor largo de cadena el compuesto sería introducido al interior de la matriz mitocondrial por la diferencia de potencial (Bastidas, H. y cols, 2022). En ese sentido, se ha visto que los largos de cadena con menos de ocho carbonos no son eficaces, los actuales compuestos que tienen TPP⁺ y que han sido aprobados por la FDA presentan diez carbonos (Wang, J. Y. y cols, 2020). Respecto a los largos de cadena impar como sería una unión con once carbonos se ha señalado que impiden la correcta interacción con la MMI, y un número mayor a doce carbonos han demostrado alta toxicidad puesto que las cadenas se doblan, lo cual no permite su ingreso del compuesto al interior de la matriz mitocondrial (Jara, J. A. y cols, 2014; Sandoval-Acuña, C. y cols, 2016).

Por lo tanto, con base en la evidencia en este trabajo de investigación decidimos estudiar los efectos del ácido cafeico unido al TPP⁺ con cuatro largos de cadena alifática: ocho, diez, once y doce carbonos (fig. 7), a fin de evaluar su efecto, selectividad y determinar qué largos de cadena son viables para futuras investigaciones.

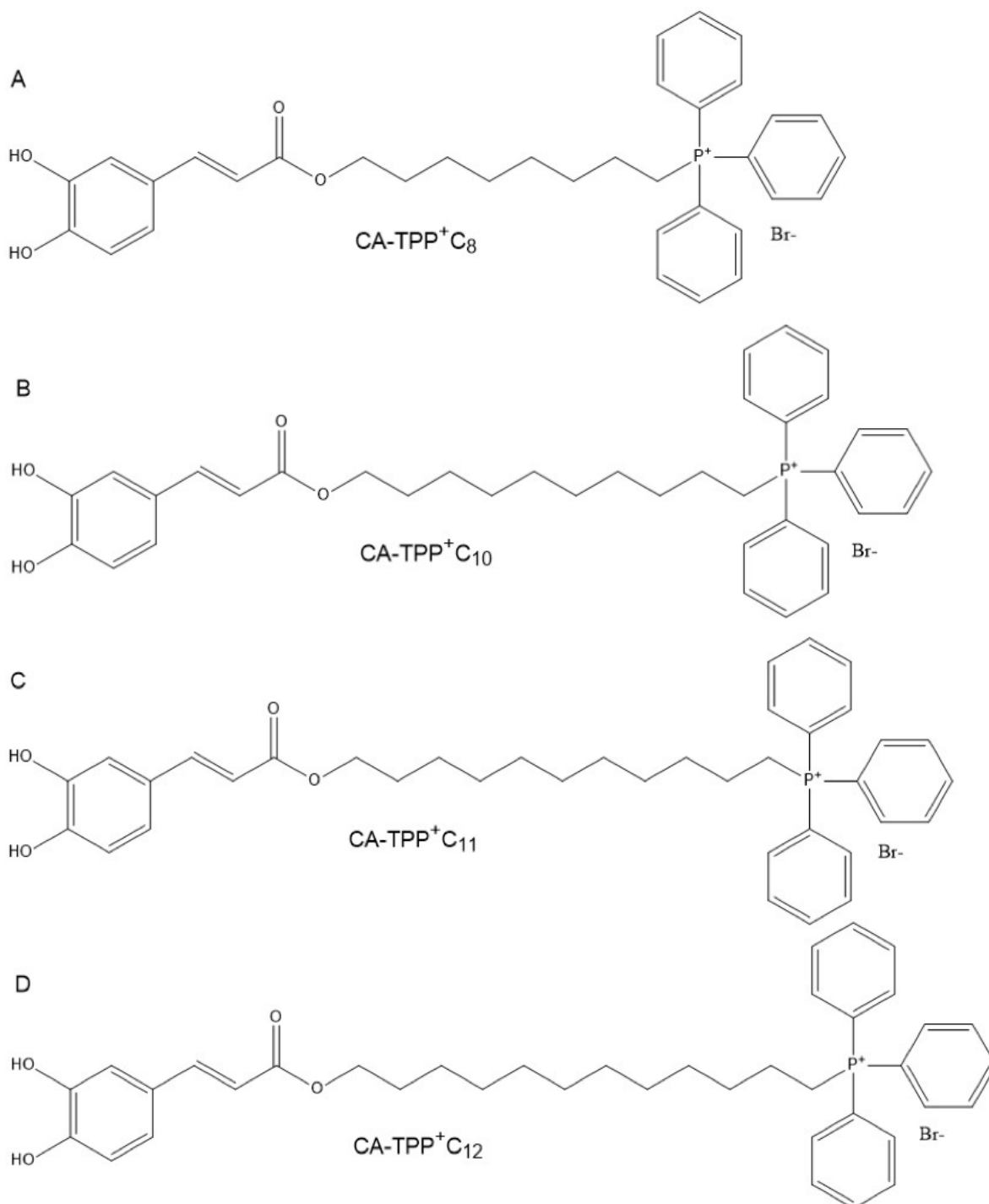


Figura 7: Estructura química de los cationes lipofílicos de ácido cafeico unidos a cuatro largos de cadena alifática. a) CA-TPP⁺C₈ b) CA-TPP⁺C₁₀ c) CA-TPP⁺C₁₁ d) CA-TPP⁺C₁₂.

Por todo ello, es que en este trabajo primero determinamos si los cationes lipofílicos de ácido cafeico (CA-TPP⁺) presentaron actividad citotóxica y luego evaluamos su efecto en la función mitocondrial.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

“Los cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico presentan actividad citotóxica a través de la inducción de una disfunción mitocondrial en líneas celulares humanas de carcinoma oral de células escamosas” (fig. 8).

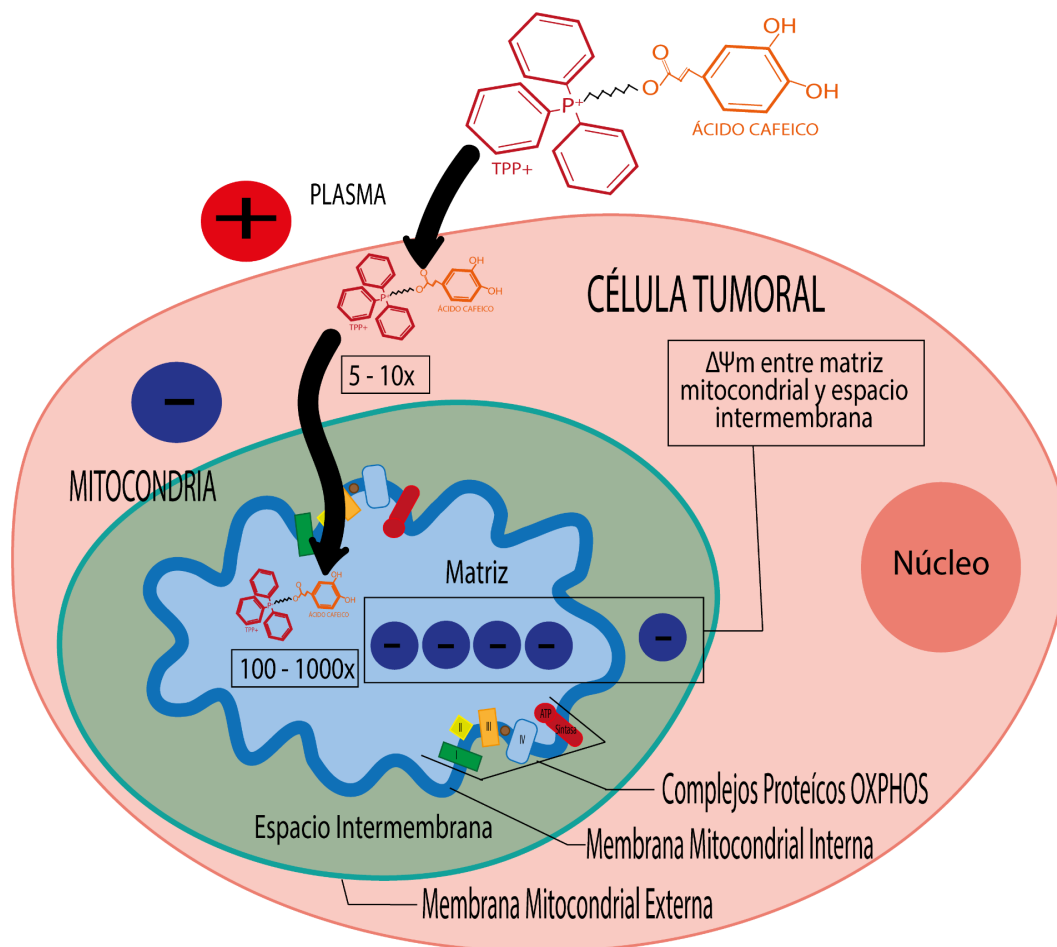


Figura 8: Representación esquemática del mecanismo de acción postulado en la hipótesis de trabajo. Elaboración propia, basada en Bastidas, H., y cols. (2022).

Objetivos

a) Objetivo General

Determinar la actividad citotóxica y el efecto mitocondrial de cationes lipofílicos de ácido cafeico en líneas celulares tumorales orales.

b) Objetivos Específicos

1. Determinar la eficacia en la inhibición de la viabilidad celular en concentraciones crecientes de los derivados del ácido cafeico en líneas celulares CAL 27 y OECM 1.
2. Estudiar el efecto de derivados del ácido cafeico sobre el funcionamiento mitocondrial en líneas celulares CAL 27 y OECM 1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

a) Compuestos

La síntesis y caracterización de los derivados lipofílicos de ácido cafeico (3,4-Dihidroxifenil)-2-propenoico) unidos al grupo trifenilfosfonio fue obtenida en una colaboración del Dr Vicente Castro en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile junto al Dr José Jara perteneciente al laboratorio de farmacología para el desarrollo de antineoplásicos y antifúngicos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Las distintas configuraciones según el largo de la cadena alifática que une al ácido cafeico con el grupo trifenilfosfonio serán Bromuro de trifenil (8 ((3,4, dihidroxifenil) oxi) octil) fosfonio (CA-TPP⁺C₈), Bromuro de trifenil (10-((3,4,-dihidroxifenil) oxi) -decil) fosfonio (CA-TPP⁺C₁₀), Bromuro de trifenil (11 - ((3,4-dihidroxifenil) oxi) -undecil) fosfonio (CA-TPP⁺C₁₁), d .

b) Reactivos

Los reactivos detallados se presentan con la traducción de su nombre: medio de Eagle modificado por Dulbecco: alto en glucosa (DMEM) de Biological Industries, Suero fetal bovino - inactivado con calor (FBS) de Biological Industries, Solución de Penicilina-Estreptomicina (cod. #03-031-1B) de Biological Industries, Solución Anfotericina B (cod. #03-028-1B) de Biological Industries, Piruvato de Sodio 100 (mM) de Gibco, Bicarbonato Sódico 7,5% de Sigma Aldrich, Tripsina EDTA Solución A 0,25% y EDTA 0,02% de Biological Industries, Solución salina tamponada con fosfato PBS [1x] de MERCK, Dimetilsulfóxido (DMSO) de Sigma Aldrich, L-Glutamina de Sigma Aldrich, Ditionito de Sodio de Sigma Aldrich, MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de Thermofisher, Ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® de Promega, Desacoplador de la fosforilación oxidativa mitocondrial (CCCP) de Abcam.

c) Líneas Celulares

Para los ensayos se utilizaron dos líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas, ambas provenientes de lengua como tejido primario OECM 1 y CAL 27, la segunda es resistente a cisplatino, actinomicina D y sulfato de vindesina (tabla 1); y una línea celular no tumoral de fibroblastos primarios (FB). Los fibroblastos orales fueron donados por la Dra. Mónica Cáceres perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Tabla 1: Caracterización de las líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas utilizadas, según su ficha técnica.

Línea Celular	Nombre Canónico	Tejido Primario	Diagnóstico del tejido	Género	Etnia	Fuente
CAL 27	CAL 27	Lengua	Carcinoma oral de células escamosas	Hombre (56 años)	Caucásico	ATCC® CRL-2095™)
OECM 1	SCC 180	Encía	Carcinoma oral de células escamosas	Hombre	Taiwanés	Sigma Aldrich

Métodos

a. Cultivos Celulares

Las células se mantendrán en DMEM alto en glucosa (4,5 g/L de glucosa), serán suplementadas con solución penicilina-estreptomina (1%), piruvato de sodio (1%), anfotericina B (1%) y suero fetal bovino (FBS) (10%).

Para disponer de las células se descartó el DMEM de las placas de cultivo celular de 100x20 mm, se lavaron 3 veces con 1000 µL de PBS cada placa, se tripsinizaron con 1000 µL por 30 minutos en el caso de la línea celular OECM 1 y 10 minutos para CAL 27, luego se inactivó la tripsina con 1000 µL de DMEM, a continuación se llevó todo el contenido de la placa de cultivo a un microtubo 1,5 mL y se centrifugó por 5 minutos a 5000 RPM, se descartó el sobrenadante y se

resuspendieron las células en 1000 μL de DMEM, para proceder con el recuento celular en la cámara de Neubauer, y finalmente realizar cada experimento (fig. 9).

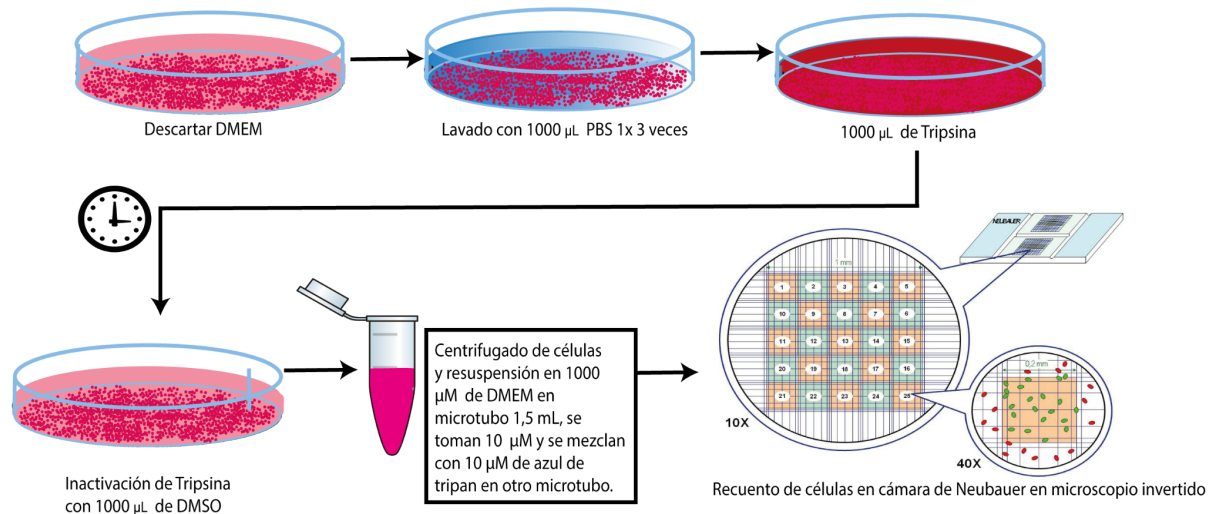


Figura 9: Esquema del manejo con tripsina en las líneas celulares *in vitro*. Imagen de elaboración propia, complementada con imagen de cámara de Neubauer obtenido de sitio web: http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.php

b. Ensayo de Viabilidad Celular MTT

La viabilidad celular se evaluó por medio del método colorimétrico MTT o bromuro de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolio. Se fundamenta en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT) de color amarillo, por parte de las oxidorreductasas mitocondriales y extramitocondriales a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas (reacción autolimitada). Los cristales de formazán insolubles se disolvieron utilizando DMSO y la disolución coloreada resultante se cuantificó midiendo la absorbancia a 570 nanómetros en el espectrofotómetro multipocillos TECAN Infinite 50. Cuanto más oscura sea la disolución, mayor será el número de células metabólicamente activas viables.

En placas de 96 pocillos de fondo plano se sembraron 10.000 células de cada línea celular en 100 μL de DMSO, se incubaron por 24 horas a 37° C° y 5% CO₂. Luego fueron tratadas a concentraciones crecientes de ácido cafeico unido a trifetilfosfonio (tabla 2) en sus 4 largos de cadena: CA-TPP⁺C₈, CA-TPP⁺C₁₀,

CA-TPP⁺C₁₁ y CA-TPP⁺C₁₂, y ácido cafeico. Cada ensayo fue realizado de manera independiente al menos 3 veces y por triplicado cada vez.

Tabla 2: Concentraciones finales de los compuestos utilizados para realizar curvas dosis-respuesta en ensayos de viabilidad celular.

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
CA-TPP⁺	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	3 µM	5 µM	10 µM	25 µM	50 µM
CA	1 µM	10 µM	25 µM	50 µM	75 µM	100 µM	150 µM	200 µM

Para el tratamiento con la línea celular OEEM 1 con el compuesto CA-TPP⁺C₈ se debieron aumentar las concentraciones, puesto que a 50 µM no presentó su total eficacia, quedando las concentraciones en un rango de 0,1 µM a 100 µM.

Tras 48 horas de tratamiento, se retiró el compuesto de los pocillos, y se colocaron 100 µL de MTT a concentración 0,5 mg/mL durante 3 horas. Se descartó el sobrenadante, los cristales de formazán se solubilizan en 40 µL de DMSO y se agitaron por 15 minutos a 37° C° (fig. 10). La absorbancia visible fue leída en el espectrofotómetro y los resultados fueron expresados en curvas sigmoideas dosis-respuesta semilogarítmicas graficadas en el programa GraphPad Prism 9.

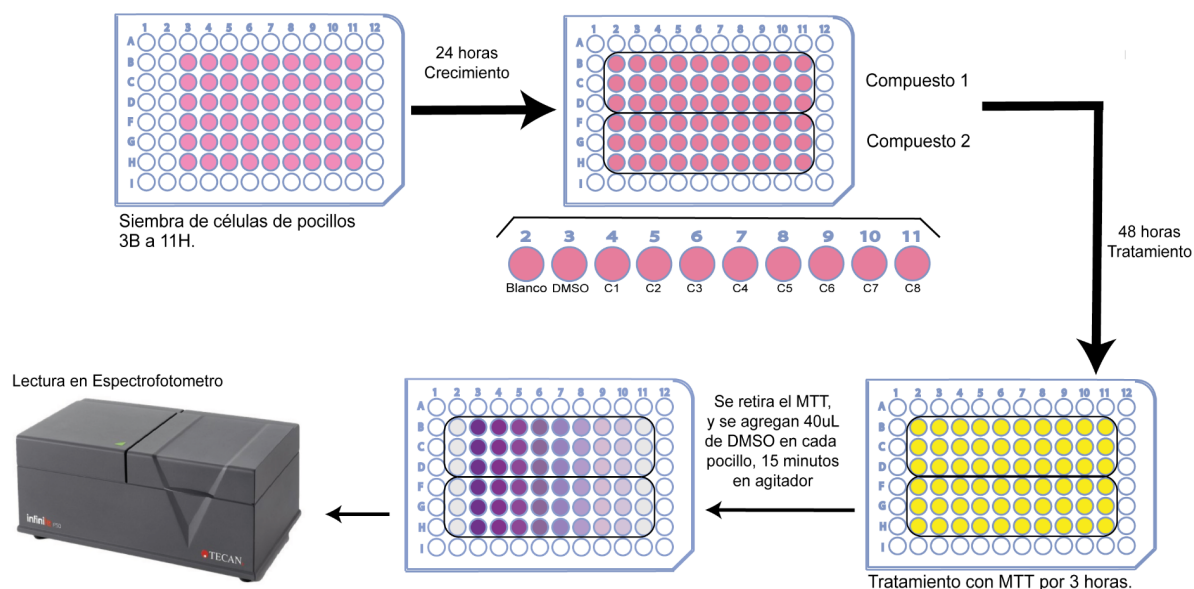


Figura 10: Esquema del procedimiento para el ensayo de viabilidad celular con MTT. La siembra se realiza en placas de 96 pocillos, un n corresponde a 9 filas por 3 columnas. El tratamiento es posterior a 24 horas de crecimiento de las células, y el ensayo de viabilidad celular a las 48 horas post aplicación de los compuestos se realiza en 10 concentraciones por triplicado para cada n.

c. Determinación de los Niveles de ATP Intracelular

Para establecer el efecto del ácido cafeico unido a trifenílfosfonio sobre el ATP celular se utilizó el kit CellTiter-Glo® *Luminescent Cell Viability Assay* (Promega, Madison, WI, EE. UU.) en las líneas celulares CAL 27 y OECM 1. Es un método para realizar la cuantificación de la producción de ATP. El ensayo se sustenta en las propiedades de una luciferasa termoestable (Ultra-Glo™ rLuciferase) que reacciona junto al ATP (autolimita la reacción) con la luciferina presente en las células para dar origen a oxiluciferina. Luego de la lisis celular da origen a la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente.

En placas de 96 pocillos de fondo plano se sembraron 10.000 células, se incubaron por 24 horas a 37 C° y 5% CO₂. Pasado el tiempo las placas se trataron con la mitad, el doble y el IC₅₀ en triplicado, concentraciones determinadas

previamente mediante el ensayo de viabilidad celular; como control positivo se utilizó CCCP [50 μ M final] y negativo el DMSO.

Transcurridas las 24 horas se retiró el fármaco contenido en DMEM, los pocillos se lavaron con 20 μ L de PBS 1x. Luego se añadieron 20 μ L de PBS junto a 20 μ L del Kit-CellTiter Glo, se agitaron las muestras a 125 RPM por 2 minutos. Finalmente, se transfirieron 30 μ L a una placa de 96 pocillos blancos de fondo plano, se esperó 15 minutos para estabilizar el compuesto, y se realizó la lectura en el espectrofluorómetro/luminómetro (fig. 11). Los resultados fueron ordenados en Excel y expresados en gráficos de barra agrupados en el programa GraphPad Prism 9.

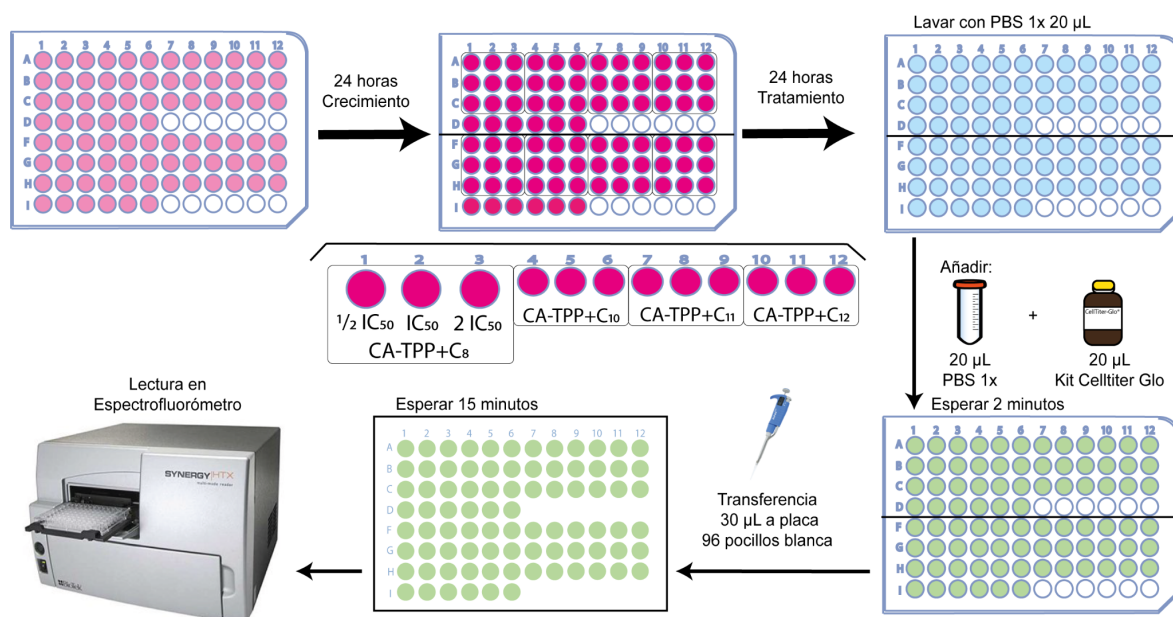


Figura 11: Esquema del procedimiento para el ensayo de viabilidad celular luminiscente Kit CellTiter-Glo®.

d. Medición del Consumo de Oxígeno

El efecto del ácido cafeico unido a TPP⁺ en el consumo de oxígeno y la respiración celular de las células tumorales OECM 1 se determinó mediante un electrodo de oxígeno Clark No. 5331 (Yellow Springs Instruments, Yellow Spring, OH, EE. UU.) que se encuentra en una cámara termorregulada sellada, la que

tiene una concentración de O_2 determinada por la presión atmosférica de la ciudad de Santiago, acoplado a un monitor YSI modelo 53 conectado a un módulo DI-148U con interfase USB, basándose en la metodología utilizada por Aguilera, 2016. Se utilizó el programa WinDag para su registro (fig. 12).

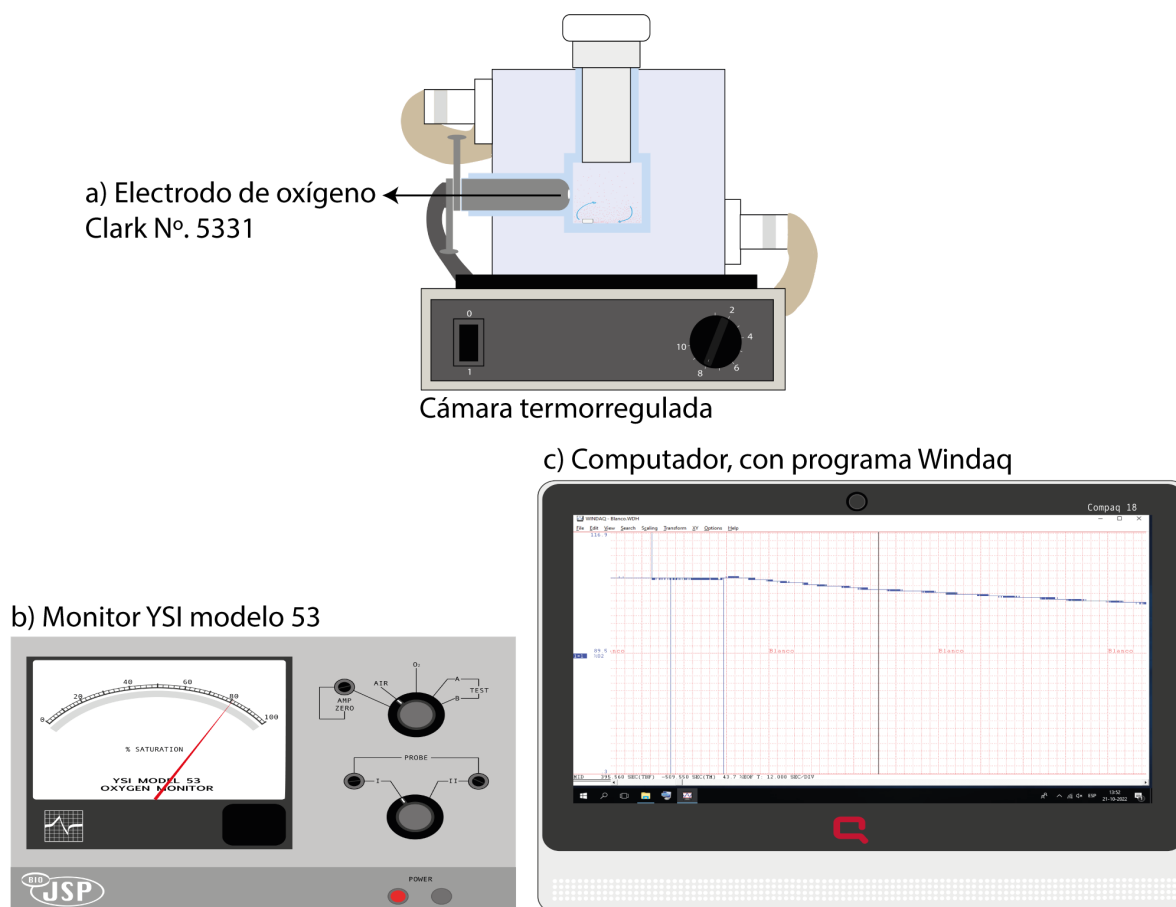


Figura 12: Esquema de los componentes del oxígrafo. A) Cámara termorregulada con el electrodo de Clark N° 5331 en posición, el electrodo al momento de prepararlo se puede retirar, en la parte superior se advierte un tornillo que también se extrae cuando se requiere lavar la cámara, se encuentra vinculado al B) Monitor YSI modelo 53 conectado a un módulo DI-148U con interfaz USB, para conectarlo al C) computador y registrar la velocidad del consumo de O_2 con el programa WinDag.

La cámara termorregulada se preparó en cada día que se utilizó lavando con agua destilada, tanto el electrodo como la cámara, posterior a ello el electrodo se secó y se dispensó una gota de KCl, para finalmente colocar una membrana de “sensibilidad estándar”. La calibración del oxígrafo, se realizó utilizando PBS a $25^{\circ}C$, fijando el 95% de O_2 , determinado por la presión atmosférica, tanto en el programa WinDag como en el monitor YSI modelo 53. A continuación se calibró el

“0% de O₂” o cero experimental, utilizando ditionito de sodio. Posteriormente, se lavó con agua destilada la cámara y el electrodo.

En cada medición se utilizaron 5×10^6 células, con el volumen correspondiente a la cantidad de células en los microtubos 1,5 mL, se centrifugaron por 3 minutos a 2500 RPM, se descartó el sobrenadante y por último se resuspendieron en 50 μ L de PBS.

Para la medición, en la cámara se colocaron 550 μ L de PBS a 25 C° al que se le añadió L-glutamina para lograr una concentración final de 16,6 μ M como sustrato, luego se colocaron las células que están contenidas en 50 μ L PBS y los compuestos, estos últimos en concentraciones que corresponden a la mitad, el doble y el IC₅₀. Se determinó el efecto de los cationes sobre la velocidad de respiración celular y se determinó el porcentaje de inhibición y/o aumento comparando las mediciones con su respectivo control (DMSO).

e. Análisis Estadístico

Para todos los experimentos se realizaron al menos 3 experimentos independientes cada uno en triplicado, y los resultados fueron expresados como el promedio \pm desviación estándar. Luego se comparan los promedios y sus desviaciones estándar con el control para evaluar si son diferentes entre sí. El análisis de varianza y promedio se realizó utilizando ANOVA, y Excel. Los análisis estadísticos se ejecutarán utilizando el software GraphPad Prism 9. Para todos los experimentos, la significación estadística fue $p < 0,05$.

En el ensayo de viabilidad celular, se utilizó un gráfico de dispersión XY, los valores fueron llevados a una escala semilogarítmica en el eje X, la que representa la concentración del compuesto aplicado, y el análisis de datos es efectuado con ANOVA regresión no lineal, utilizando un modelo dosis-respuesta - inhibidor de pendiente variable que analiza cuatro parámetros. Para comparar

entre los valores de IC_{50} entre los compuestos, en Graph Prism 9 se utilizaron los valores netos (sin desviación estándar) de cada IC_{50} .

Para la determinación de los niveles de ATP intracelular, los datos se trabajaron en Excel donde primero se calculó el promedio de la luminiscencia de cada compuesto a cada concentración, además de los controles. Posteriormente se calculó el porcentaje de variación respecto del DMSO (equivalente al 100%), para realizar el análisis en Graph Prism 9. En Graph Prism 9 se utilizó un gráfico de columnas, con dos barras de agrupación definidas por columnas y filas, el tipo de análisis estadístico ANOVA que se aplicó es unidireccional ordinario. Para comparar si la variación entre el ATP y la viabilidad celular con MTT tuvo una variación significativa, se utilizó un análisis agrupado ANOVA, bidireccional (o modelo mixto).

En la medición del consumo de oxígeno, WinDaq los datos son graficados Graph Prism 9 en un gráfico de dispersión XY, del que se obtiene la pendiente de respiración. Estas pendientes, luego son trabajadas en Excel, donde se calcula el promedio de cada n y la desviación estándar, en porcentaje. A continuación, estos datos son llevados a Graph Prism 9 mediante un gráfico agrupado, ingresando los datos de promedio, desviación estándar y cantidad n; el que se analiza con ANOVA unidireccional ordinario.

RESULTADOS

1. Evaluación de Viabilidad

La viabilidad celular fue evaluada en líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas resistente y no resistente a cisplatino: CAL 27 y OECM 1 respectivamente, y en fibroblastos normales mediante ensayo con el método colorimétrico MTT, los resultados fueron expresados en curvas semilogarítmicas dosis respuesta. La eficacia a las células tumorales fue determinada al comparar la viabilidad celular a concentraciones crecientes de los compuestos entre el ácido cafeico y los cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico, ambos a 48 horas de tratamiento.

1.1 Línea Celular CAL 27

El tipo de gráfico con curva semilogarítmica dosis respuesta, nos permite determinar a través de la curva si el compuesto fue eficaz, o sea, si produjo respuesta biológica en este caso sobre la viabilidad celular: podemos observar que todas las curvas llegan a cero en el eje Y, el que se corresponde con la viabilidad celular, por lo tanto, los cuatro cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico fueron eficaces, con una relación concentración dependiente en un rango de 0,1 a 50 μM (fig. 13).

Al mismo tiempo, nos posibilita establecer mediante el análisis de datos la concentración necesaria para que se produzca un efecto equivalente al 50% del efecto máximo, conocido como IC_{50} , a menor valor de IC_{50} mayor potencia del compuesto, en el gráfico se puede constatar cómo la curva que se encuentre más desplazada hacia la izquierda en el eje X. Por consiguiente, en la tabla 3 se muestran los IC_{50} obtenidos para cada catión lipofílico de ácido cafeico.

CAL 27

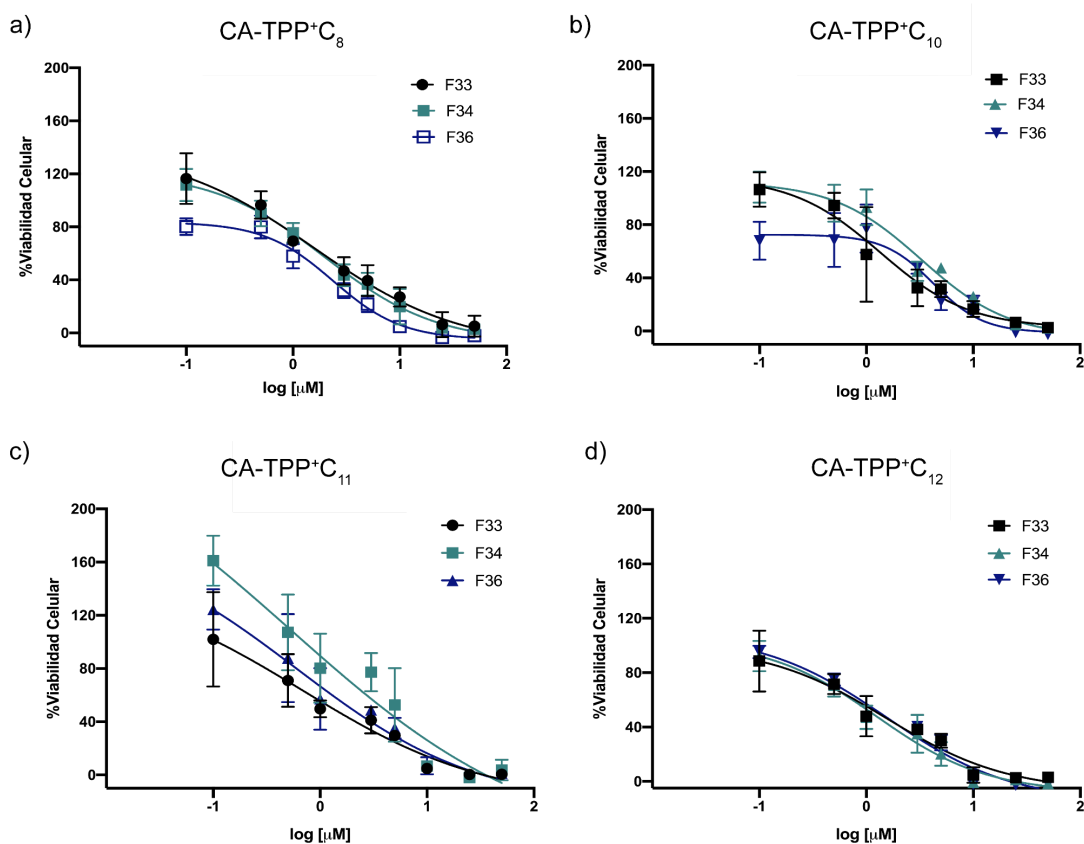


Figura 13: Viabilidad celular en CAL 27 posterior a 48 de tratamiento con a) CA-TPP+C₈ b) CA-TPP+C₁₀ c) CA-TPP+C₁₁ d) CA-TPP+C₁₂

Curvas semi-logarítmicas de concentración efecto en la viabilidad celular en línea celular CAL 27 tratadas con concentraciones crecientes [0,1 a 50 μM] de cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico (a) CA-TPP+C₈, (b) CA-TPP+C₁₀, (c) CA-TPP+C₁₁ y (d) CA-TPP+C₁₂ respectivamente, a 48 hrs. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 3: Concentraciones de IC₅₀ en CAL 27 obtenidas a partir de ensayo colorimétrico MTT.

CAL 27	CA-TPP+C ₈	CA-TPP+C ₁₀	CA-TPP+C ₁₁	CA-TPP+C ₁₂
IC ₅₀ [μM]	2,956 ± 1,48	1,979 ± 0,4	0,6024 ± 0,07	1,447 ± 0,17
≈ IC ₅₀ [μM]	3	2	0,5	1,5
r ²	0,9131	0,9584	0,8773	0,9317

Los valores fueron obtenidos del promedio de tres experimentos independientes más su desviación estándar. ≈ IC₅₀ es la aproximación del resultado del IC₅₀ utilizada para realizar los ensayos. r² representa el promedio del ajuste lineal.

El largo de cadena alifática con más potencia fue el de once carbonos (CA-TPP⁺C₁₁) (fig. 13 – c); a la vez es el compuesto que tiene la menor desviación estándar (tabla 3). CA-TPP⁺C₈ fue el menos potente y presenta la mayor dispersión entre sus datos.

Entre los cuatro cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico solo CA-TPP⁺C₁₁ y CA-TPP⁺C₈ presentan una diferencia estadísticamente significativa entre sus valores de IC₅₀ al realizar la evaluación estadística, con un valor de P < 0,05 (fig. 14).

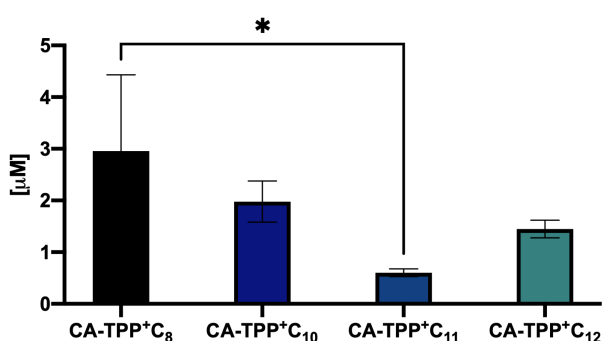


Figura 14: Comparación estadística de los valores de IC₅₀ en CAL 27.

Nota: *p < 0,05 indica una diferencia significativa entre las concentraciones de IC₅₀ entre CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₁. El valor de p fue calculado usando el análisis de varianza bidireccional (ANOVA).

El ácido cafeico se observa mucho menos eficaz que las moléculas estudiadas, ya que a 200 μM se observa una eficacia de aproximadamente un 20% de citotoxicidad (fig. 15). Aunque no se calculó el valor de IC₅₀ para el ácido cafeico, es evidente que este es menos potente que los derivados de ácido cafeico unidos a TPP⁺.

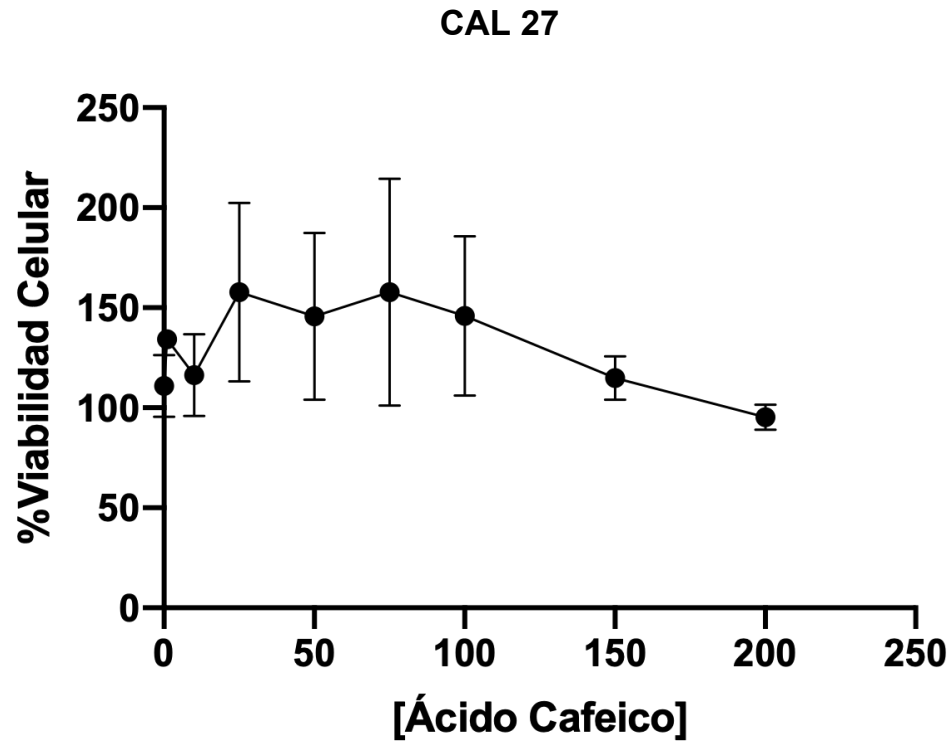


Figura 15: Viabilidad celular en CAL 27 posterior a 48 de tratamiento con Ácido Cafeico.

Curva líneal de concentración efecto en la viabilidad celular en línea celular CAL 27 tratadas con concentraciones crecientes [1 a 200 µM] de ácido cafeico a 48 hrs. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se obtuvo del promedio de dos ensayos independientes (F33, F34).

1.2 Línea Celular OECM 1

Respecto a la línea celular OECM 1 se advirtió al igual que en CAL 27, una disminución de la viabilidad celular concentración dependiente como efecto de los cuatro cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico (fig. 16).

OECM 1

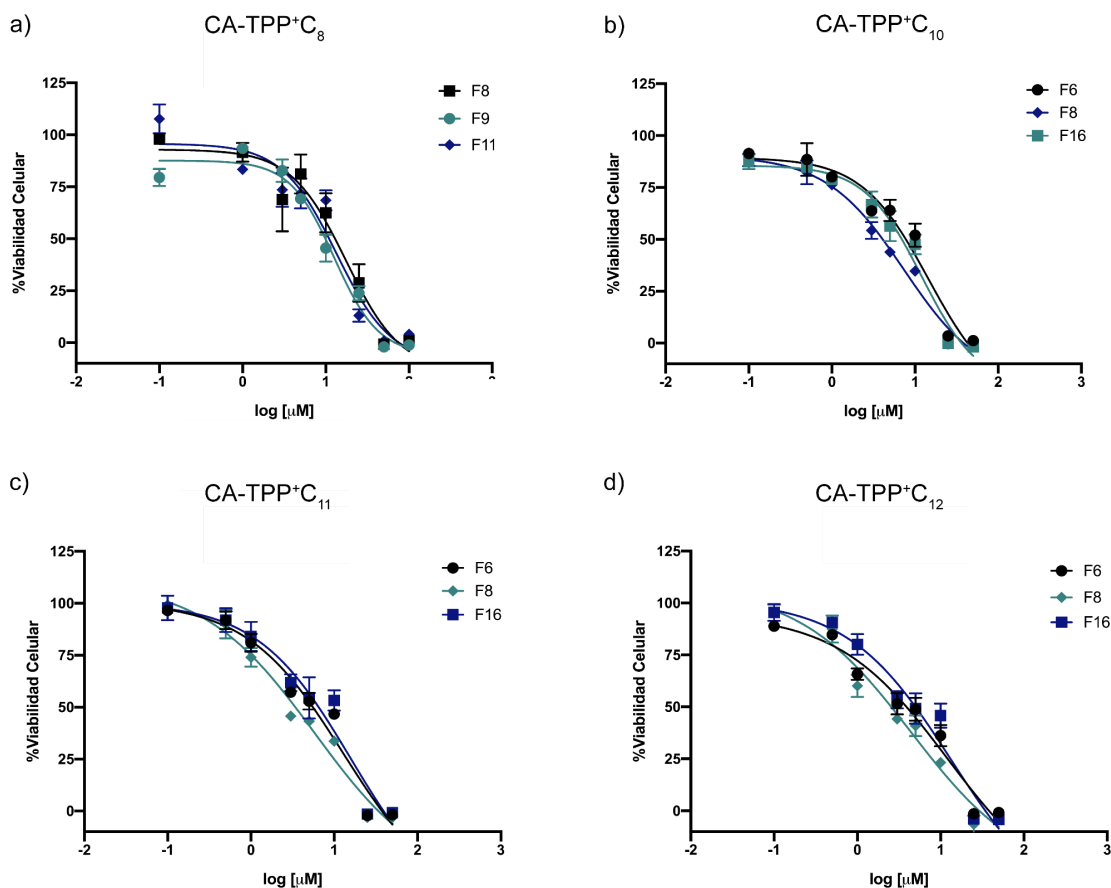


Figura 16: Viabilidad celular en OECM 1 posterior a 48 de tratamiento con a) CA-TPP+C₈ b) CA-TPP+C₁₀ c) CA-TPP+C₁₁ d) CA-TPP+C₁₂.

Curvas semi-logarítmicas de concentración efecto en la viabilidad celular en línea celular OECM 1 tratadas con concentraciones crecientes [0,1 a 50 µM] de cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico (a) CA-TPP+C₈, (b) CA-TPP+C₁₀, (c) CA-TPP+C₁₁ y (d) CA-TPP+C₁₂ respectivamente, a 48 hrs. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Para CA-TPP+C₁₀, CA-TPP+C₁₁ y CA-TPP+C₁₂ se observó una eficacia del 100% a la concentración de 50 µM; no obstante, CA-TPP+C₈ fue el único catión lipofílico en el que se tuvo que aumentar la concentración final de 50 µM a 100 µM para tener una eficacia del 100%.

En relación al IC₅₀ como se puede observar en la tabla 4, OECM 1 se condice con CAL 27 en que CA-TPP+C₈ presentó el mayor valor, el orden de los demás largo de cadena fue CA-TPP+C₁₁, CA-TPP+C₁₀ y finalmente CA-TPP+C₁₂. La diferencia entre sus concentraciones inhibitorias del 50% varían en rangos de unidad, mas no resultan significativas entre sí ($p > 0,05$) (ver anexo 4).

Tabla 4: Concentraciones de IC₅₀ en OECM 1 obtenidas a partir de ensayo colorimétrico MTT.

OECM 1	CA-TPP+C ₈	CA-TPP+C ₁₀	CA-TPP+C ₁₁	CA-TPP+C ₁₂
IC ₅₀ [μM]	14,49 ± 2.62	11,3 ± 3.64	11,55 ± 5.19	9,96 ± 4.85
≈ IC ₅₀ [μM]	15	11	12	10
r ²	0,9445	0,9667	0,9568	0,9582

Los valores fueron obtenidos del promedio de tres experimentos independientes más su desviación estándar. ≈ IC₅₀ es la aproximación del resultado del IC₅₀ utilizada para realizar los ensayos. r² representa el promedio del ajuste no lineal.

Sobre al ácido cafeico, la concentración 200 μM tuvo una eficacia máxima aproximada de un 20% sobre la viabilidad celular (fig. 17), si bien tuvo efecto citotóxico tampoco se pudo establecer su IC₅₀ con las concentraciones evaluadas.

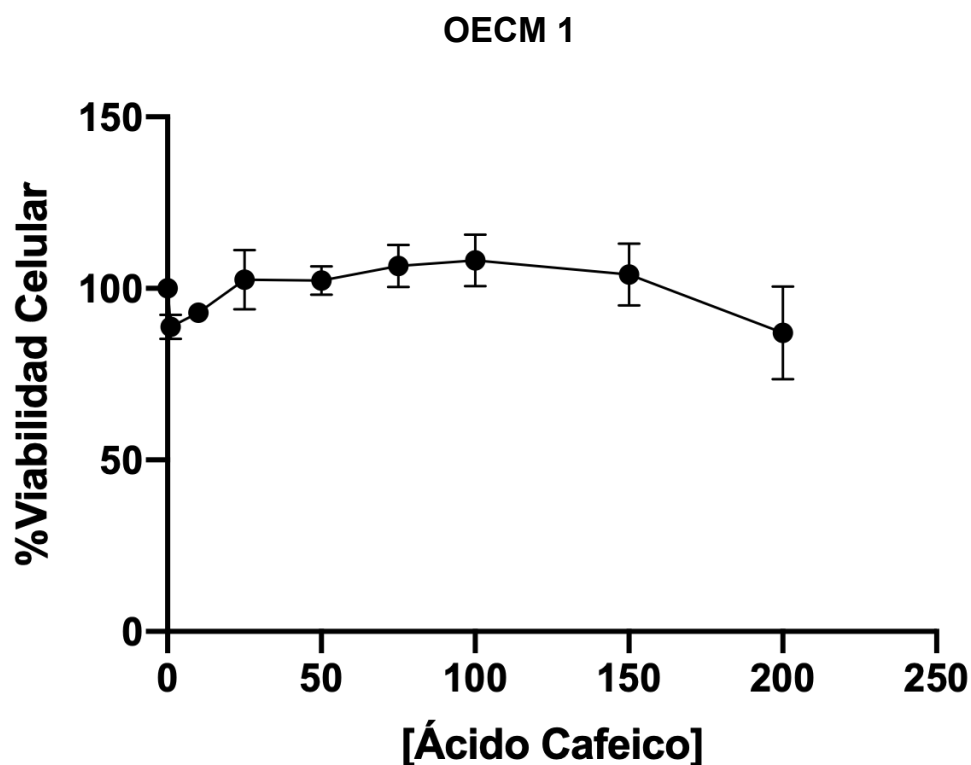


Figura 17: Viabilidad celular en OECM 1 posterior a 48 de tratamiento con Ácido Cafeico. Curva líneal de concentración efecto en la viabilidad celular en línea celular OECM 1 tratadas con concentraciones crecientes [1 a 200 μM] de ácido cafeico a 48 hrs. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se obtuvo del promedio de tres ensayos independientes (F8, F9, F11).

Para ambas líneas celulares los resultados coinciden en que los cationes lipofílicos tienen efecto citotóxico con un 100% de efectividad, así mismo tanto en CAL 27 como en OECM 1 el compuesto con menor potencia fue CA-TPP⁺C₈.

Al comparar los valores de IC₅₀, advertimos que existe una diferencia estadísticamente significativa entre CAL 17 y OECM 1 para el mismo compuesto (fig.18), ahora esta no es relevante puesto que se encuentra dentro del mismo rango de magnitud.

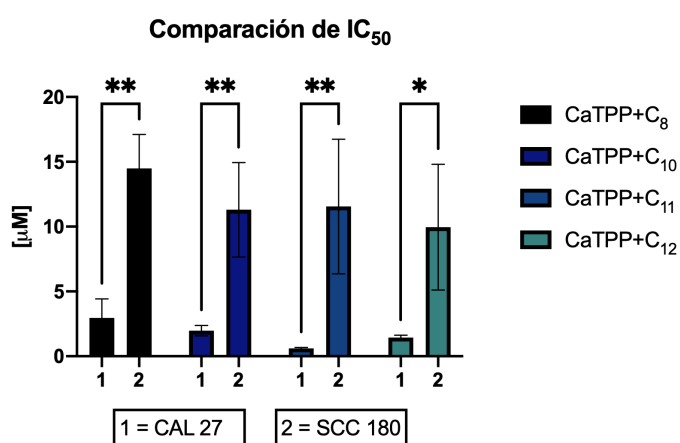


Figura 18: Comparación estadística de los valores de IC₅₀ entre las dos líneas celulares tumorales orales.

Nota: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ indica una diferencia significativa entre las concentraciones de IC₅₀ obtenidas para cada catión lipofílico de ácido cafeico en las líneas celulares de CAL 27 y OECM 1, respectivamente. El valor de p fue calculado usando el análisis de varianza ANOVA de dos vías (o modelo mixto).

1.3 Línea Celular de Fibroblastos

Los cuatro cationes lipofílicos de ácido cafeico fueron citotóxicos en los fibroblastos, con una eficacia concentración-dependiente [0,1 a 50 μM] (fig. 19).

Referente al IC₅₀ se puede ver en la tabla 5 que sus concentraciones fueron similares a las obtenidas con la línea celular tumoral OECM 1. El compuesto con menor potencia fue CA-TPP⁺C₈, al igual que en las células tumorales, y el compuesto con mayor potencia su CA-TPP⁺C₁₀.

FIBROBLASTOS

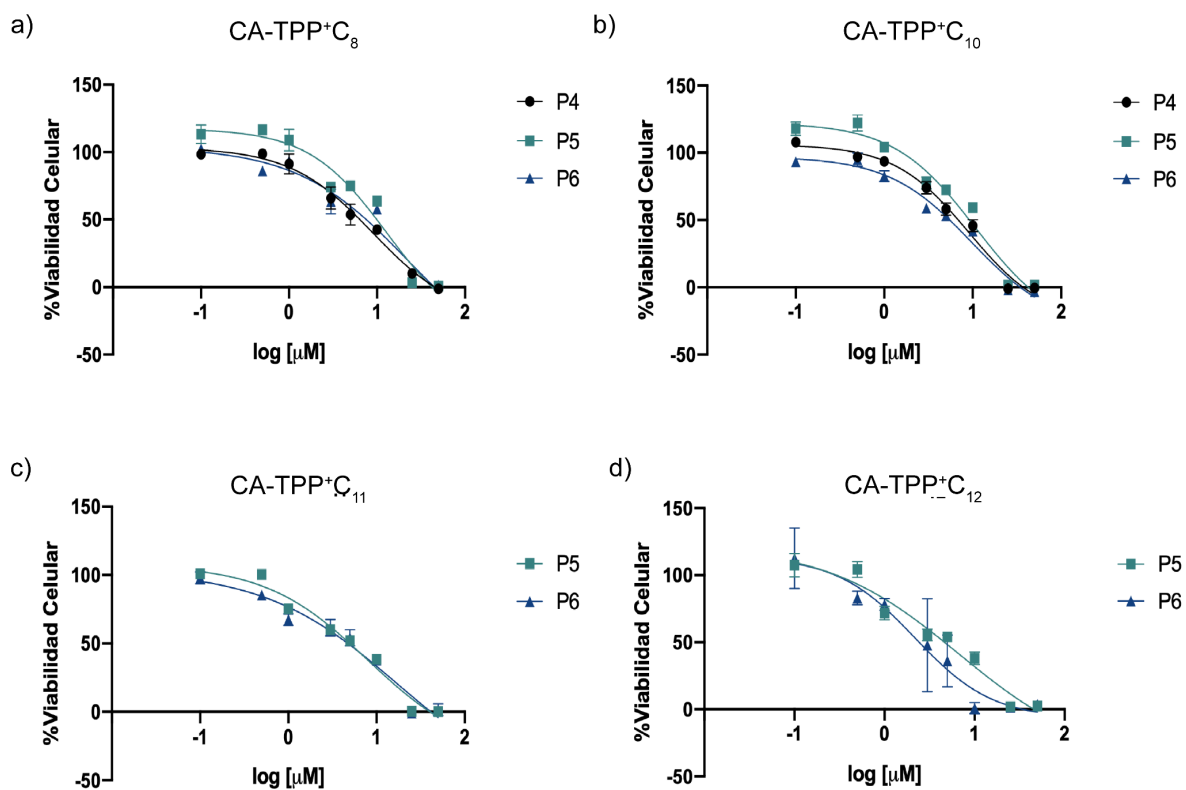


Figura 19: Viabilidad celular en fibroblastos posterior a 48 de tratamiento con a) CA-TPP+C₈ b) CA-TPP+C₁₀ c) CA-TPP+C₁₁ d) CA-TPP+C₁₂.

Curvas semi-logarítmicas de concentración efecto en la viabilidad celular en línea celular FIBROBLASTOS ORALES tratadas con concentraciones crecientes [0,1 a 50 μM] de cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico (a) CA-TPP+C₈, (b) CA-TPP+C₁₀, (c) CA-TPP+C₁₁ y (d) CA-TPP+C₁₂ respectivamente, a 48 hrs. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 5: Concentraciones de IC₅₀ de fibroblastos obtenidas a partir de ensayo colorimétrico MTT.

FB	CA-TPP+C ₈	CA-TPP+C ₁₀	CA-TPP+C ₁₁	CA-TPP+C ₁₂
IC ₅₀ [μM]	14,66 ± 6,84	9,79 ± 0,84	12,47 ± 6,5	10,91 ± 11,46
r ²	0,9563	0,9709	0,9509	0,9108

Los valores fueron obtenidos del promedio de al menos dos experimentos independientes más su desviación estándar. r² representa el promedio del ajuste lineal.

El ácido cafeico no mostró efecto citotóxico en las células de fibroblastos, en la figura 20 se puede apreciar que la viabilidad celular se encuentra aumentada (fig. 20). Por consiguiente, exhibió un comportamiento distinto en células sanas versus células tumorales orales.

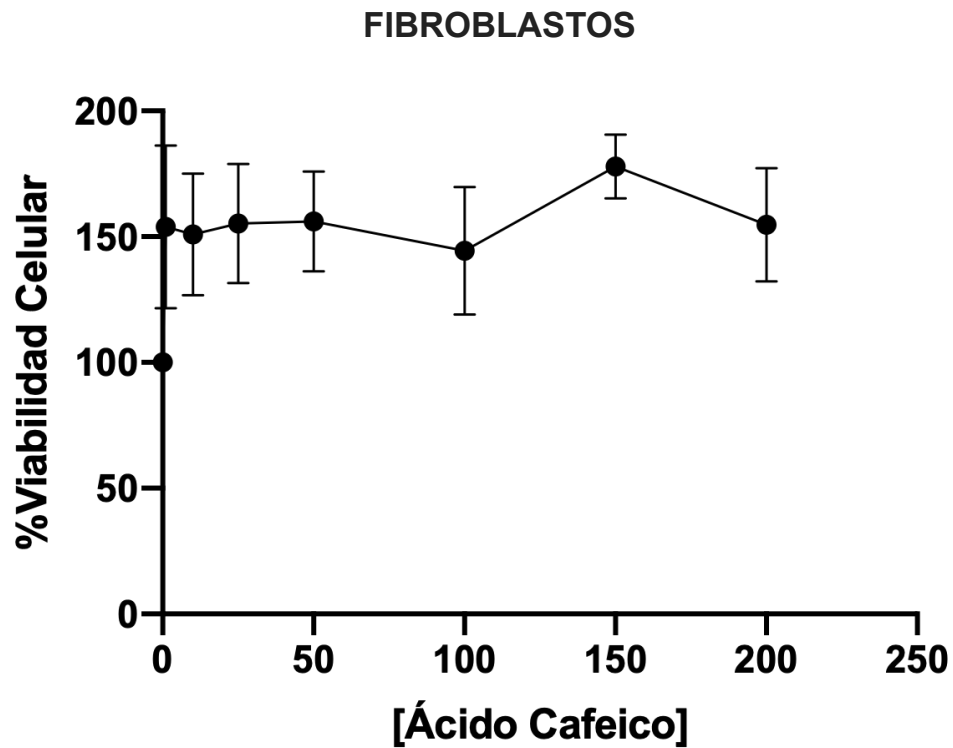


Figura 20: Viabilidad celular en fibroblastos posterior a 48 de tratamiento con Ácido Cafeico. Curva lineal de concentración efecto en la viabilidad celular en línea celular FIBROBLASTOS ORALES tratadas con concentraciones crecientes [1 a 200 µM] de ácido cafeico a 48 hrs. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se obtuvo del promedio de tres ensayos independientes (P4, P5, P6).

Se calculó el índice de selectividad de cada largo de cadena de los cationes lipofílicos de ácido cafeico, con la línea celular no tumoral frente a ambas líneas celulares tumorales CAL 27 y OECM 1, mediante la razón de sus IC_{50} obtenidos en los ensayos previos (tabla 6).

Tabla 6: Índice de selectividad de los cationes lipofílicos derivados de ácido cafeico a 48 horas de tratamiento.

Compuestos				
	CA-TPP ⁺ C ₈	CA-TPP ⁺ C ₁₀	CA-TPP ⁺ C ₁₁	CA-TPP ⁺ C ₁₂
FB/CAL 27	4,97	4,94	20,7	7,54
FB/ OECM 1	1,02	-0,87	1,08	1,09

Los derivados que presentaron mayor selectividad fueron CA-TPP⁺C₁₁ y CA-TPP⁺C₁₂, siendo el primero el más selectivo de toda la serie. Entre CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ no hubo una diferencia significativa en su selectividad.

CA-TPP⁺C₁₀ tuvo un valor de selectividad negativo entre OECM 1 y los FB, lo que indica que el compuesto tiene mayor afinidad por las células no tumorales que no son resistentes al cisplatino.

2. Evaluación del contenido de adenosín trifosfato.

Con el propósito de conocer si los compuestos estudiados inhiben el contenido y/o la síntesis de ATP intracelular, se determinaron los niveles de ATP intracelular mediante el Kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Su control negativo fue DMSO, que corresponde al vehículo de los compuestos. Para el control positivo se utilizó un desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial (CCCP) que inhibió la producción de ATP.

El ensayo se realizó a 24 horas de tratamiento, y para establecer que la disminución de ATP se debiera únicamente a una reducción en su producción y no a la disminución en la cantidad de células vivas, se realizó un ensayo de viabilidad celular con MTT en las mismas condiciones del ensayo de ATP.

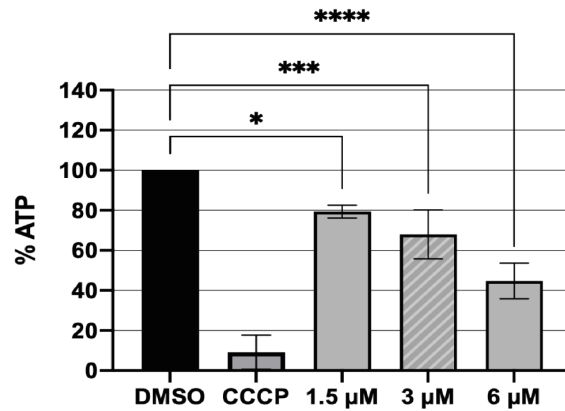
Los resultados obtenidos del Kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay fueron trabajados para ser expresados en porcentaje de cantidad de ATP intracelular, y los resultados del ensayo de viabilidad celular con MTT también fueron expresados en porcentaje de cantidad de células vivas. Esto con el fin de posteriormente poder comparar el contenido de ATP intracelular respecto de la cantidad de células vivas, ya que ambos son ensayos de viabilidad celular con un fundamento diferente.

2.1 Línea Celular CAL 27

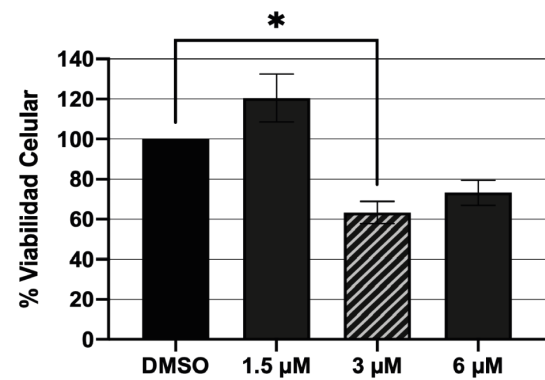
A continuación, se presentan los gráficos obtenidos tras el tratamiento con el IC_{50} , la mitad y el doble para CAL 27 al medir el contenido de ATP intracelular (fig 21A, 22A, 23A y 24A) y el ensayo de control de la viabilidad celular realizado con MTT (Figura 21B, 22B, 23B y 24B), también se añadió un gráfico que compara estadísticamente ambos valores (fig. 21C, 22C, 23C y 24C), para los cuatro largos de cadena de los cationes lipofílicos de ácido cafeico, respectivamente.

CAL 27 CA-TPP+C₈

A) Contenido de ATP intracelular



B) Viabilidad celular



C) Comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular

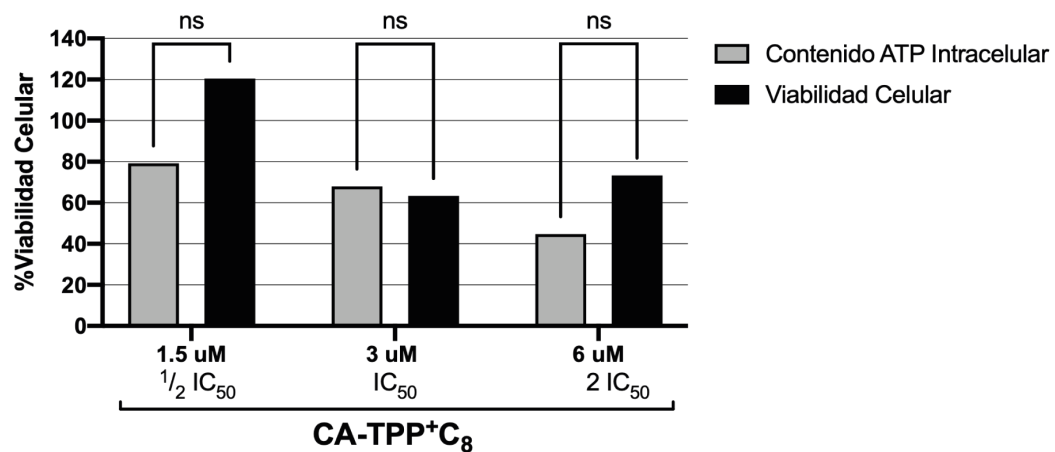


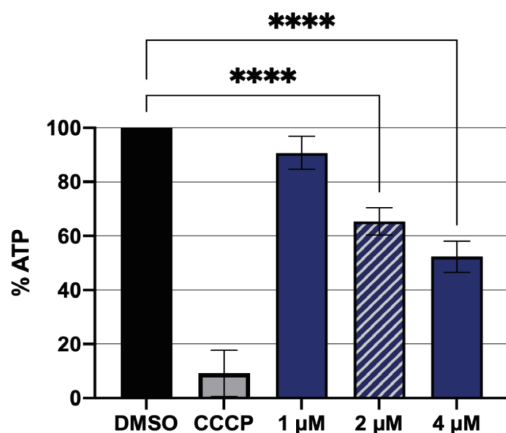
Figura 21: A) Contenido de ATP intracelular B) Viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP+C₈. C) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad. El gráfico de barras A representa el contenido de ATP intracelular en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento, el gráfico de barras B representa la cantidad de células metabólicamente activas en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento. El gráfico de barras C representa la comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular, en porcentaje a la misma concentración de trabajo. Los pasajes utilizados para determinar el ATP fueron F34, F19, F18, F20 (4n); y para MTT fueron F19 y F20 (2n). *P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001

Los porcentajes de variación del contenido de ATP intracelular luego del tratamiento CA-TPP+C₈ respecto del control negativo fueron 79,3% en 1,5 μM, 68% en 3 μM y 44,7% en 6 μM (fig. 21A) y de la viabilidad fueron 120,5% en 1,5 μM, 63,4% en 3 μM y 73,3% en 6 μM (fig.21B), respectivamente. Sobre la

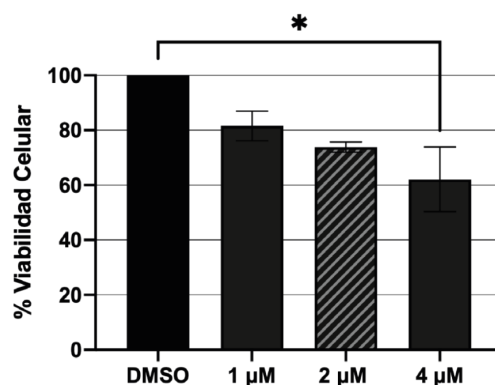
diferencia aritmética entre el ATP y el MTT, a concentración 1,5 μM la disminución fue de 41,2%, a 3 μM hubo un aumento del ATP de 4,6% y a 6 μM la disminución del ATP fue de 28,6%.

CAL 27 CA-TPP⁺C₁₀

A) Contenido de ATP intracelular



B) Viabilidad celular



C) Comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular

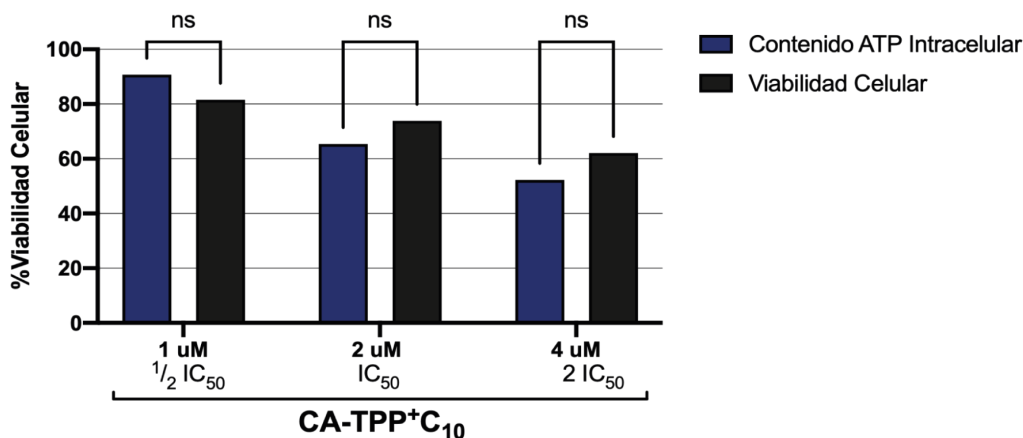


Figura 22: A) Contenido de ATP intracelular B) Viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP⁺C₁₀. C) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.

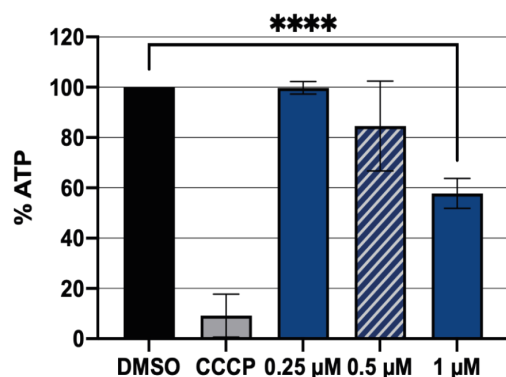
El gráfico de barras A representa el contenido de ATP intracelular en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento, el gráfico de barras B representa la cantidad de células metabólicamente activas en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento. El gráfico de barras C representa la comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular, en porcentaje a la misma concentración de trabajo. Los pasajes utilizados para determinar el ATP fueron F34, F19, F18, F20 (4n); y para MTT fueron F19 y F20 (2n). *P<0,05 ****P<0,0001

Los porcentajes de variación del contenido de ATP intracelular luego del tratamiento CA-TPP+C₁₀ respecto del control negativo fueron 90,7% en 1 μ M, 65,4% en 2 μ M y 52,3% en 4 μ M (fig. 22A) y de la viabilidad fueron 81,6% en 1 μ M, 73,8% en 2 μ M y 62,1% en 4 μ M (fig. 22B), respectivamente. La diferencia aritmética entre el ATP y MTT a concentración 1 μ M fue un aumento del ATP de 9,1%, a 2 μ M y a 4 μ M una disminución del 8,4% y 9,8% respectivamente.

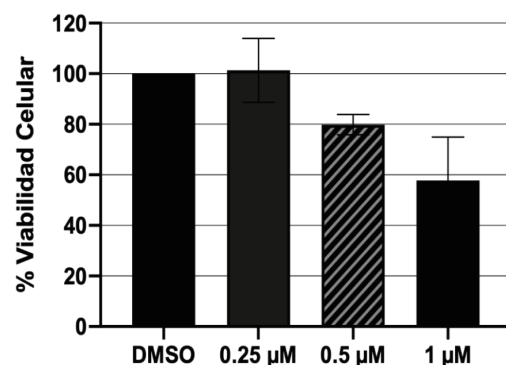
En CA-TPP+C₈ a concentración 1,5 μ M se evidencia un aumento de la cantidad de células vivas y al doble del IC₅₀ se apreció una disminución del ATP. CA-TPP+C₁₀ disminuyó el contenido de ATP con el IC₅₀ y su doble, demostrado con una resta de los valores netos. En ambos compuestos, la variación del contenido de ATP respecto a la viabilidad celular no fue estadísticamente significativa.

CAL 27 CA-TPP⁺C₁₁

A) Contenido de ATP intracelular



B) Viabilidad celular



C) Comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular

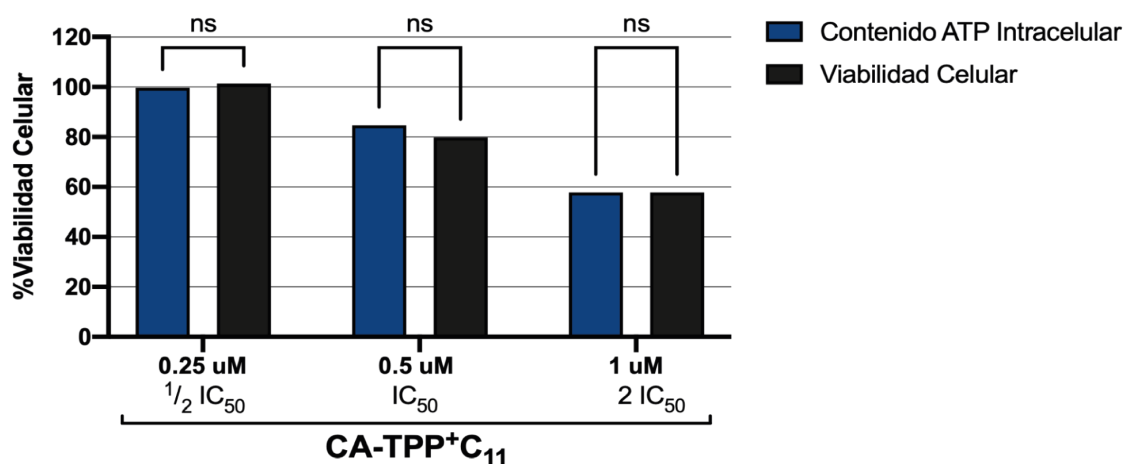


Figura 23: A) Contenido de ATP intracelular B) Viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP⁺C₁₁. C) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.

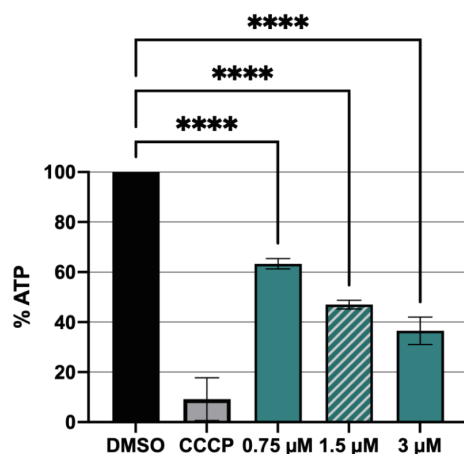
El gráfico de barras A representa el contenido de ATP intracelular en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento, el gráfico de barras B representa la cantidad de células metabólicamente activas en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento. El gráfico de barras C representa la comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular, en porcentaje a la misma concentración de trabajo. Los pasajes utilizados para determinar el ATP fueron F34, F19, F18, F20 (4n); y para MTT fueron F19 y F20 (2n). ****P<0,0001

Los porcentajes de variación del contenido de ATP intracelular luego del tratamiento CA-TPP⁺C₁₁ fueron 99,7% en 0,25 μM, 84,6% en 0,5 μM y 57,8% en 1 μM (fig. 23A) y de la viabilidad fueron 101,3% en 0,25 μM, 79,9% en 0,5 μM y

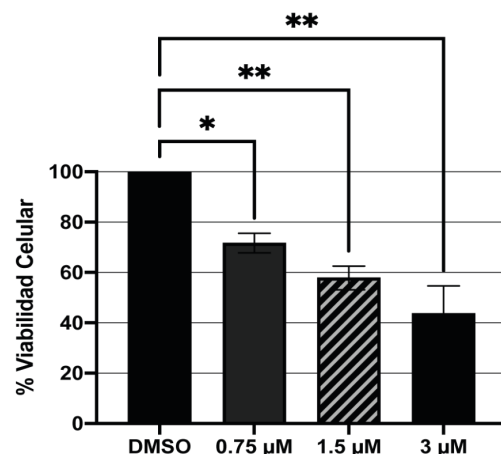
57,8% en 1 μM (fig. 23B), respectivamente. La diferencia entre el ATP y MTT de 0,25 μM fue una disminución de 1,6%, en 0,5 μM un aumento de 4,7 y a 1 μM no hubo diferencia.

CAL 27 CA-TPP+C₁₂

A) Contenido de ATP intracelular



B) Viabilidad celular



C) Comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular

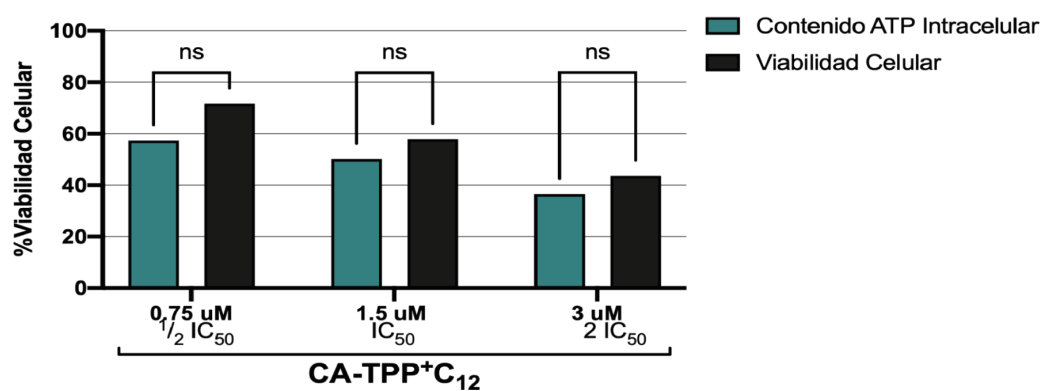


Figura 24: A) Contenido de ATP intracelular B) Viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP+C₁₂. C) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.

El gráfico de barras A representa el contenido de ATP intracelular en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento, el gráfico de barras B representa la cantidad de células metabólicamente activas en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento. El gráfico de barras C representa la comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular, en porcentaje a la misma concentración de trabajo. Los pasajes utilizados para determinar el ATP fueron F34, F19, F18, F20 (4n); y para MTT fueron F19 y F20 (2n). ****P<0,0001

Los porcentajes de variación del contenido de ATP intracelular luego del tratamiento CA-TPP+C₁₂ fueron 57,4% en 0,75 µM, 50,2% en 1,5 µM y 36,5% en 3 µM (fig. 24-A.1) y de la viabilidad fueron 71,7% en 0,75 µM, 57,8% en 1,5 µM y 43,7% en 3 µM (fig. 24-A.2), respectivamente. La diferencia aritmética en 0,75 µM fue de una disminución de 14%, en 1,5 µM de 7,6% y en 3 µM de 7,2% entre el MTT y ATP.

CA-TPP+C₁₁ fue el que tuvo menor diferencia entre el ATP y MTT, y CA-TPP+C₁₂ fue el único que tuvo disminución del contenido de ATP en las tres concentraciones evaluadas, ambas comparaciones hablando en términos aritméticos. La disminución del contenido de ATP en estos compuestos tampoco fue estadísticamente significativa.

Finalmente, aunque en las figuras 21A, 22A, 23A, y 24A se aprecia una disminución estadísticamente significativa del contenido de ATP intracelular, al comparar esta disminución con el ensayo de viabilidad MTT (21B, 22B, 23B y 24B), podemos apreciar que la reducción de ATP se debió a que disminuyeron la cantidad de células vivas y no a que hubiese menor producción de ATP. En consecuencia, en la línea celular tumoral oral resistente a cisplatino CAL 27 los cuatro largos de cadena alifática de los cationes lipofílicos de ácido cafeico no tuvieron un efecto estadísticamente significativo.

2.2 Línea Celular OECM 1

Con OECM 1 se realizó el mismo sistema de ensayos que con CAL 27, con tratamiento a concentración IC₅₀, la mitad y el doble, los resultados se muestran respectivos al largo de cadena, desde menor valor a mayor valor, con el mismo formato antes presentado (fig. 25, 26, 27 y 28).

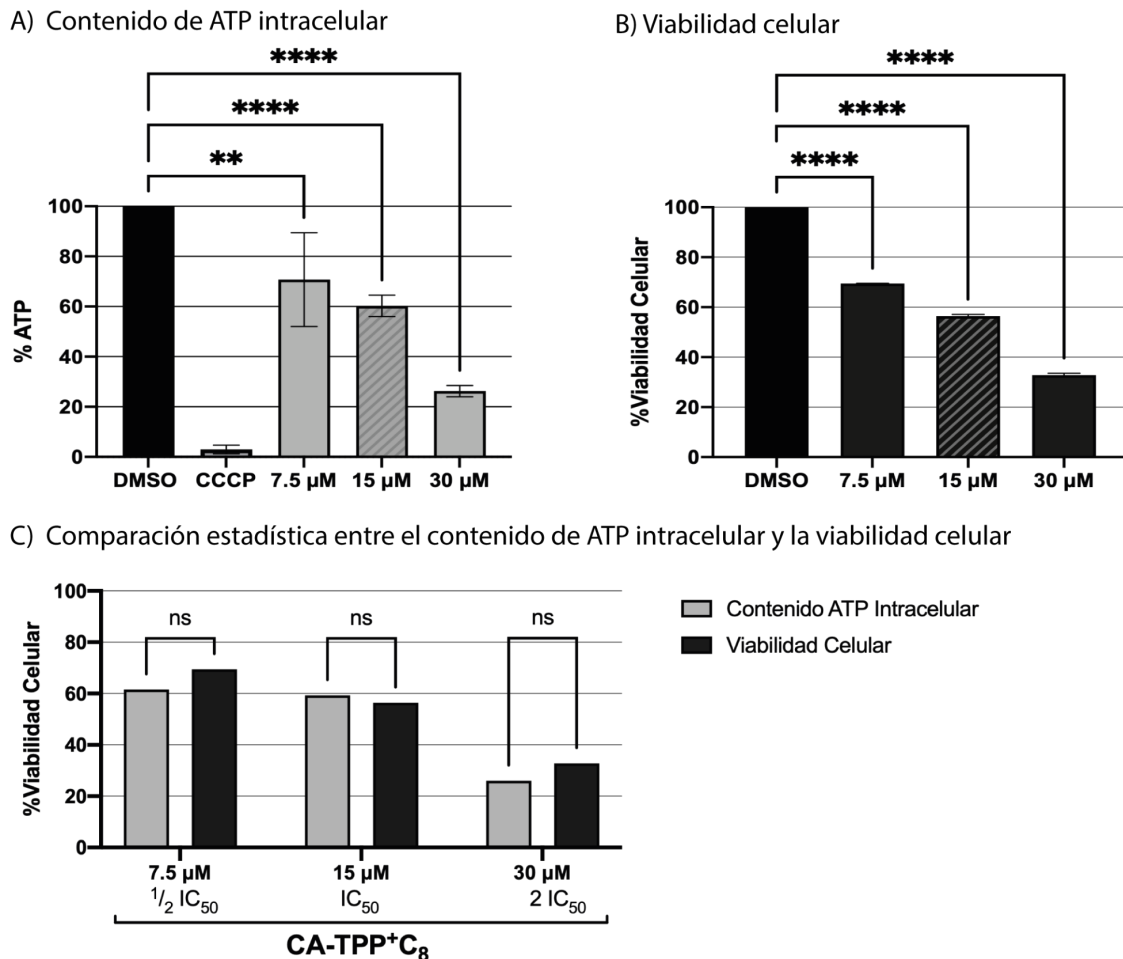
OECM 1 CA-TPP⁺C₈

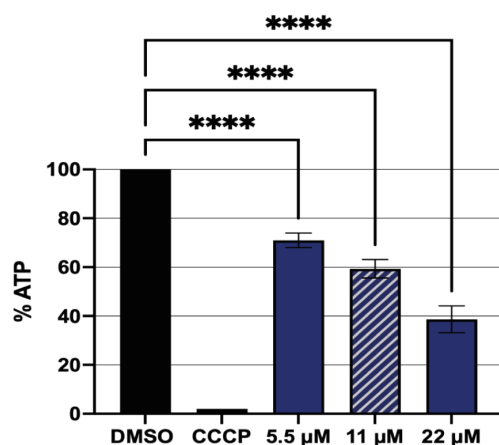
Figura 25: A) Contenido de ATP intracelular B) Viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP⁺C₈. C) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.

El gráfico de barras A representa el contenido de ATP intracelular en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento, el gráfico de barras B representa la cantidad de células metabólicamente activas en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento. El gráfico de barras C representa la comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular, en porcentaje a la misma concentración de trabajo. Los pasajes utilizados para determinar el ATP fueron F13, F15, F16 (3n); y para MTT fueron F8 y F9 (2n). *P<0.01 ****P<0,0001.

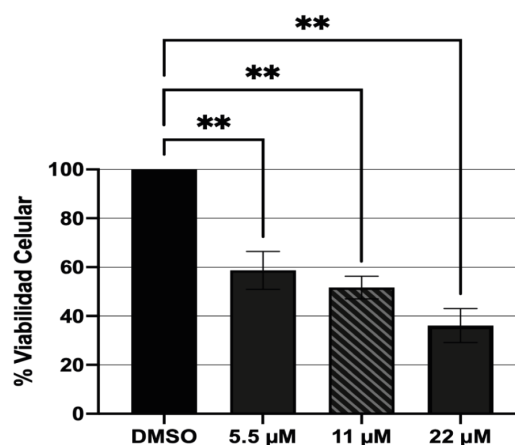
Los porcentajes de variación en CA-TPP⁺C₈ respecto del control negativo del contenido de ATP fueron 61,7% en 7,5 μM, 59,3% en 15 μM y 26% en 30 μM (fig. 25A) y de la viabilidad fueron 69,5% en 7,5 μM, 56,4% en 15 μM y 32,8% en 30 μM (fig. 25B), respectivamente. La diferencia aritmética entre el MTT y el ATP a concentración 7,5 μM fue una disminución de 7,8%, a 15 μM hubo un aumento del ATP de 2,9% y a 30 μM la disminución del ATP fue de 6,8%.

OECM 1 CA-TPP+C₁₀

A) Contenido de ATP intracelular



B) Viabilidad celular



C) Comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular

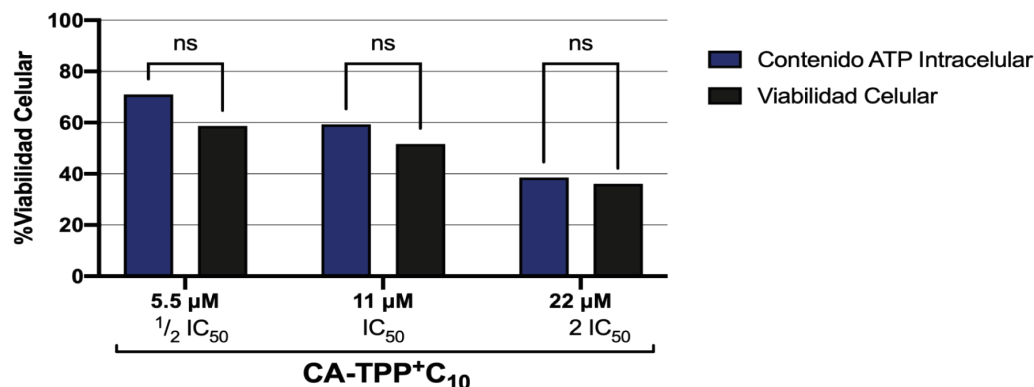


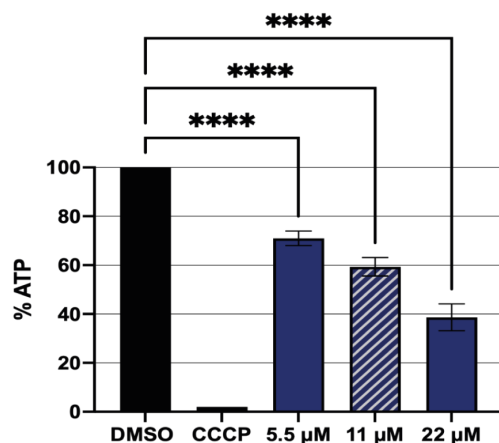
Figura 26: A) Contenido de ATP intracelular B) Viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP+C₁₀. C) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.

El gráfico de barras A representa el contenido de ATP intracelular en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento, el gráfico de barras B representa la cantidad de células metabólicamente activas en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento. El gráfico de barras C representa la comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular, en porcentaje a la misma concentración de trabajo. Los pasajes utilizados para determinar el ATP fueron F13, F15, F16 (3n); y para MTT fueron F8 y F9 (2n). **P<0,01 ****P<0,0001

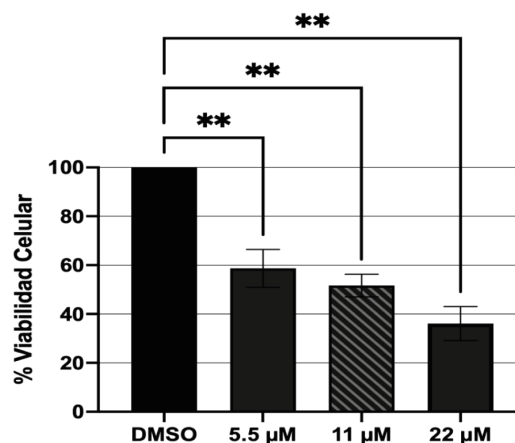
Los porcentajes de variación de CA-TPP+C₁₀ respecto del control negativo del contenido de ATP fueron 71% en 5,5 μM, 59,3% en 11 μM y 38,7% en 22 μM (fig. 26A) y de la viabilidad fueron 58,7% en 5,5 μM, 51,7% en 11 μM y 36,1% en 22 μM (fig. 26B), respectivamente. La diferencia aritmética entre el MTT y el ATP a concentración 5,5 μM y 11 μM fue un aumento de 12,3% y 7,6%, a 22 μM fue una disminución del ATP de 2,6%.

OECM 1 CA-TPP+C₁₀

A) Contenido de ATP intracelular



B) Viabilidad celular



C) Comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular

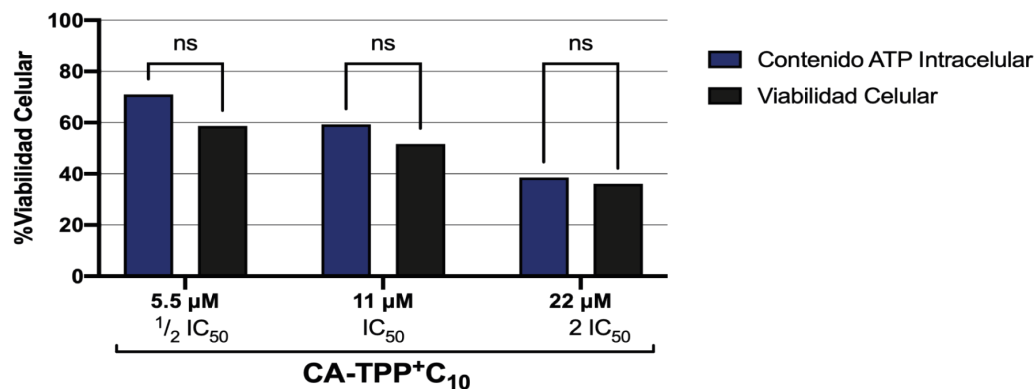


Figura 27: A) Contenido de ATP intracelular B) Viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP+C₁₁. C) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.

El gráfico de barras A representa el contenido de ATP intracelular en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento, el gráfico de barras B representa la cantidad de células metabólicamente activas en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento. El gráfico de barras C representa la comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular, en porcentaje a la misma concentración de trabajo. Los pasajes utilizados para determinar el ATP fueron F13, F15, F16 (3n); y para MTT fueron F8 y F9 (2n). **P<0,01 ***P<0,001 ****P<0,0001

Los porcentajes de variación de CA-TPP+C₁₁ respecto del control negativo del contenido de ATP fueron 60% en 6 μM, 44,7% en 12 μM y 2% en 24 μM (fig. 27A) y de la viabilidad fueron 56,5% en 6 μM, 37,2% en 12 μM y -0,7% en 24 μM (fig. 27B), respectivamente. La diferencia aritmética de 6 μM, 12 μM y 24 μM fue un aumento de 3,5%; 7,5% y 2,7% respectivamente.

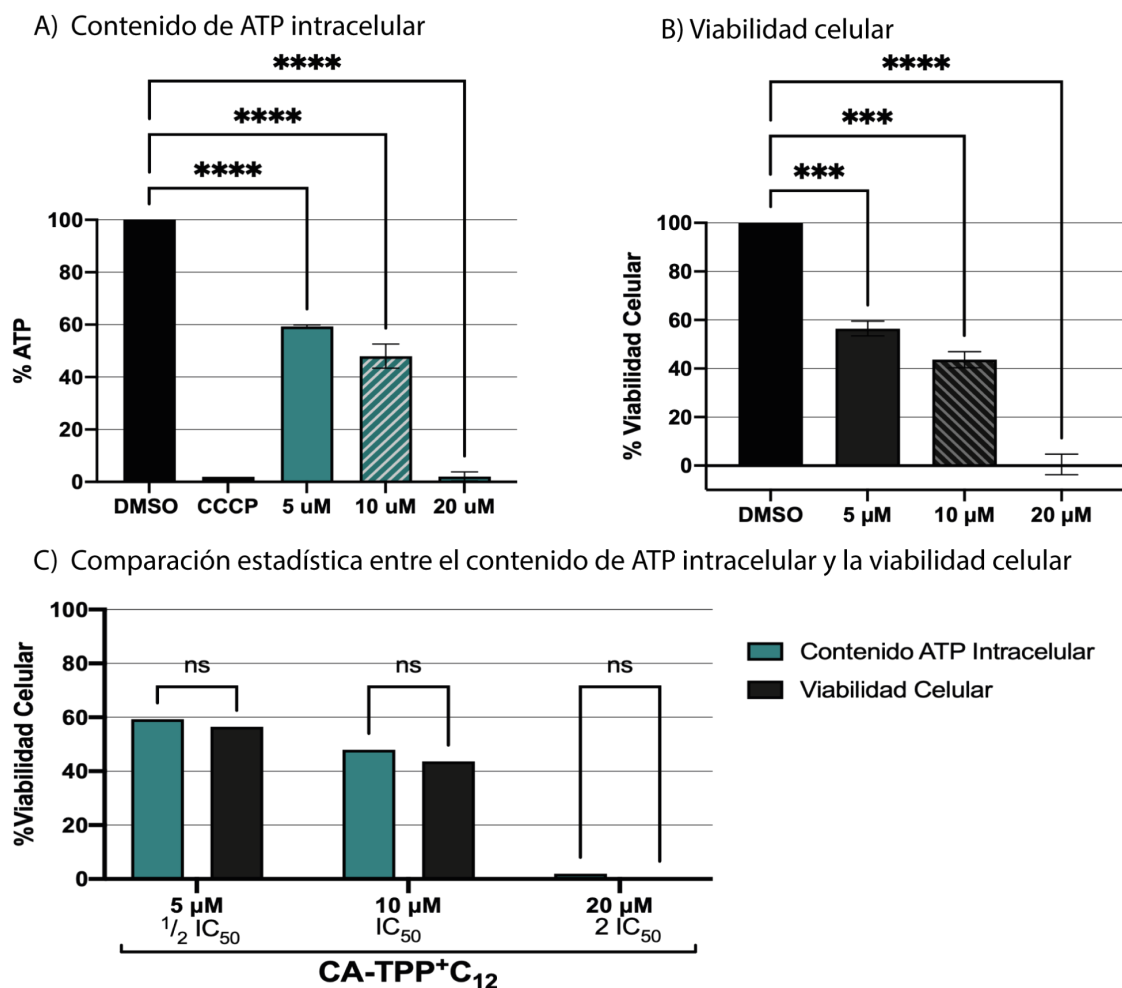
OECM 1 CA-TPP+C₁₂

Figura 28: A) Contenido de ATP intracelular B) Viabilidad celular, ambos en CAL 27 a 24 horas de tratamiento con CA-TPP+C₁₂. C) Comparación entre ambas variaciones de viabilidad.

El gráfico de barras A representa el contenido de ATP intracelular en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento, el gráfico de barras B representa la cantidad de células metabólicamente activas en porcentaje luego de 24 horas de tratamiento. El gráfico de barras C representa la comparación estadística entre el contenido de ATP intracelular y la viabilidad celular, en porcentaje a la misma concentración de trabajo. Los pasajes utilizados para determinar el ATP fueron F13, F15, F16 (3n); y para MTT fueron F8 y F9 (2n). ***P<0,001 ****P<0,0001

Los porcentajes de variación de CA-TPP+C₁₂ respecto del control negativo del contenido de ATP fueron 59,3% en 5 μM, 48% en 10 μM y 2% en 20 μM (fig. 28A) y de la viabilidad fueron 56,5% en 5 μM, 43,7% en 10 μM y 1,06% en 20 μM (fig. 28B), respectivamente. La diferencia entre el MTT y ATP de 5 μM, 10 μM y 20 μM un aumento de 2,8%, 4,3% y 0,94%.

En general, se observa que a todas las concentraciones siempre hay disminución tanto de la cantidad de ATP como de la viabilidad celular, situación que no fue así con CAL 27.

Tal como ocurrió con CAL 27, en OECM 1 no hubo una diferencia estadísticamente significativa en el contenido de ATP intracelular luego del tratamiento por 24 horas con los cationes lipofílicos de ácido cafeico (fig. 25-B, 26-B, 27-B y 28-B), lo que implica que el efecto citotóxico de los cationes lipofílicos de ácido cafeico puede deberse a que actúa a otro nivel molecular; o bien, si es que ejerce inhibición de la fosforilación oxidativa la producción de ATP es compensada mediante el proceso de glicólisis u otros mecanismos descritos previamente.

3. Medición del consumo de Oxígeno

Se midió el consumo de oxígeno de las células tumorales OECM 1, luego de la aplicación inmediata del compuesto mediante la determinación de la pendiente de velocidad de consumo de oxígeno (fig. 29). A fin de establecer esta velocidad basal detectada por el electrodo para cada día en que se realizó el experimento, se realizó un control del consumo de oxígeno sólo con células en PBS y luego con DMSO.

Se constató la respiración celular mediante el cambio de pendiente, que es representativa de un cambio en la velocidad del consumo de oxígeno. En cada catión lipofílico de ácido cafeico se utilizaron tres concentraciones: IC_{50} , $\frac{1}{2} IC_{50}$ y el $2 IC_{50}$.

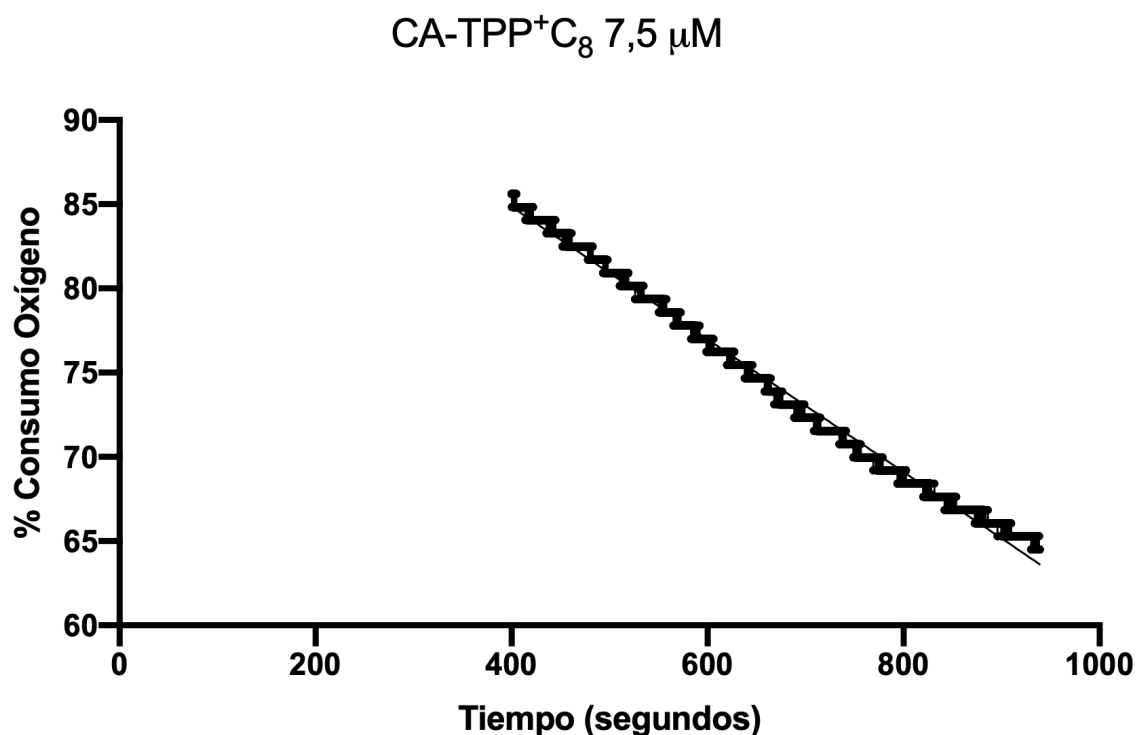


Figura 29: Gráfico representativo de la pendiente de la velocidad de consumo de oxígeno obtenida con OECM 1 tras el tratamiento con CA-TPP⁺C₈. En este gráfico se observa el extracto de la curva utilizado para el cálculo de la pendiente de la velocidad del consumo de oxígeno, para el análisis posterior de los datos.

Las gráficas de velocidad de consumo de oxígeno se expresaron en porcentaje, obtenido mediante la pendiente de la recta del DMSO como la velocidad consumo de oxígeno normal versus la pendiente de la recta de cada compuesto. Los resultados sobre 100% indican que aumentó la velocidad de consumo de oxígeno, los resultados bajo ella muestran una disminución de la velocidad de consumo.

3.1 Línea Celular OECM 1

CA-TPP⁺C₈ presenta en sus tres concentraciones un aumento del consumo de O₂. Las concentraciones que son estadísticamente significativas son la mitad y el doble del IC₅₀ (fig. 30).

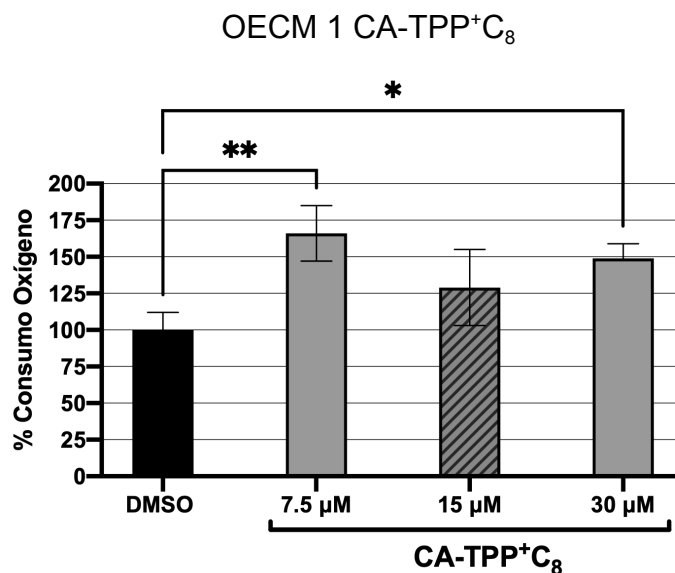


Figura 30: Relación de consumo de oxígeno en OECM 1 luego del tratamiento CA-TPP⁺C₈ con respecto al control negativo.

El gráfico de barras representa el porcentaje de consumo de oxígeno utilizado de las células tumorales OECM 1, luego del tratamiento con el catión lipofílico CA-TPP⁺C₈ utilizando como control negativo el DMSO. El promedio de velocidad de consumo de oxígeno de 7,5 μM es 166% (Desviación estándar (DE)=19%), de 15 μM es 129% (DE=26%) y 30 μM es 149% (DE=10%). Las barras fueron obtenidas con 3n de distintos días con un pasaje entre F11 a F19. *P<0,05 **P<0,01

CA-TPP⁺C₁₀ presentó una diferencia significativa solo con su concentración IC₅₀ con respecto al control, sin embargo, entre sus concentraciones no tuvo diferencias estadísticamente significativas (fig. 31).

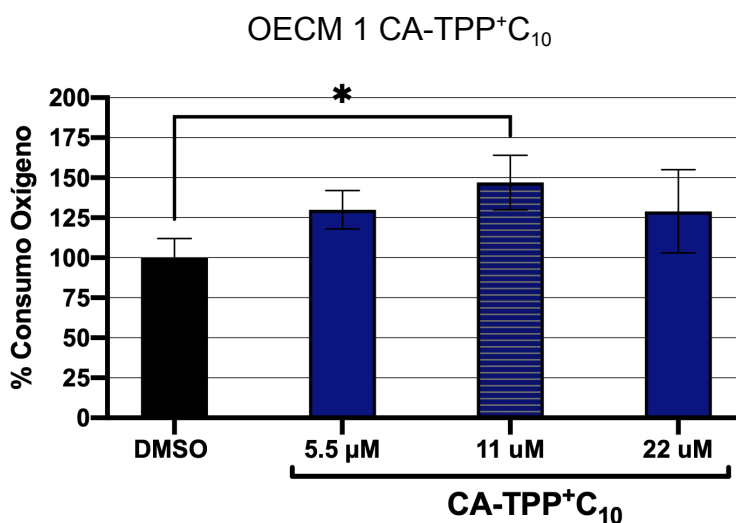


Figura 31: Relación de consumo de oxígeno en OECM 1 luego del tratamiento CA-TPP⁺C₁₀ con respecto al control negativo.

El gráfico de barras representa el porcentaje de consumo de oxígeno utilizado de las células tumorales OECM 1, luego del tratamiento con el catión lipofílico CA-TPP⁺C₁₀ utilizando como control negativo el DMSO. El promedio de velocidad de consumo de oxígeno de 5,5 μM es 130% (DE=12%), de 11 μM es 147% (DE=17%) y 22 μM es 129% (DE=26%). Las barras fueron obtenidas con 3n de distinto día con un pasaje entre F11 a F19. *P<0,05

CA-TPP⁺C₁₁ tiene un aumento significativo del consumo de O₂ con respecto al control negativo en sus tres concentraciones (fig.32). Ahora, entre los compuestos el aumento es significativo entre 6 μM y 24 μM (P<0,001), y 12 μM con 24 μM (P<0,01), por lo que no hubo variación entre la mitad del IC₅₀ y el IC₅₀.

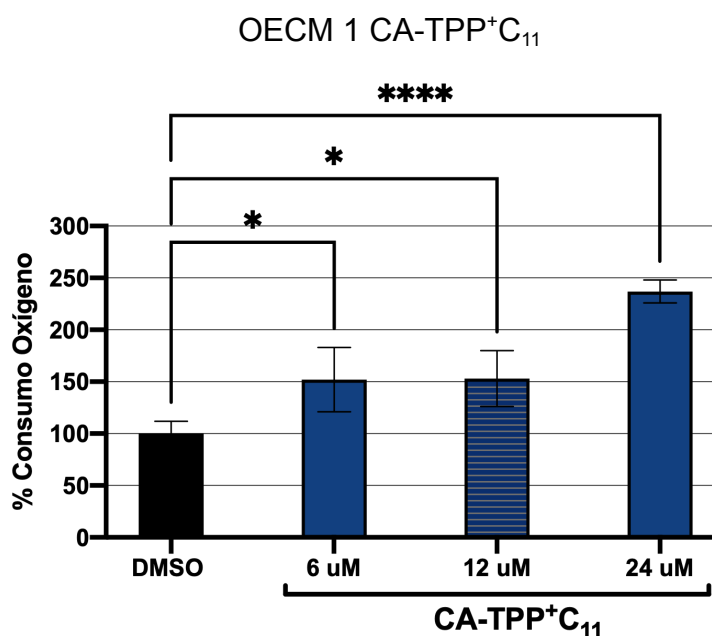


Figura 32: Relación de consumo de oxígeno en OECM 1 luego del tratamiento CA-TPP⁺C₁₁ con respecto al control negativo.

El gráfico de barras representa el porcentaje de consumo de oxígeno utilizado de las células tumorales OECM 1, luego del tratamiento con el catión lipofílico CA-TPP⁺C₁₁ utilizando como control negativo el DMSO. El promedio de velocidad de consumo de oxígeno de 6 μM es 152% (DE=31%), de 12 μM es 153% (DE=27%) y 24 μM es 237% (DE=11%). Las barras fueron obtenidas con al menos 3n de distinto día con un pasaje entre F11 a F19. *P<0,05 ****P<0,0001

El aumento del consumo de O₂ sólo fue estadísticamente significativo en CA-TPP⁺C₁₂ para 5 μM, entre los compuestos hubo diferencias significativas entre 5 μM con 10 μM (P<0,05) y 5 μM con 20 μM (P<0,05) (fig. 33). Sin embargo, solo con los valores netos se observa que a mayor concentración hay un menor consumo de O₂.

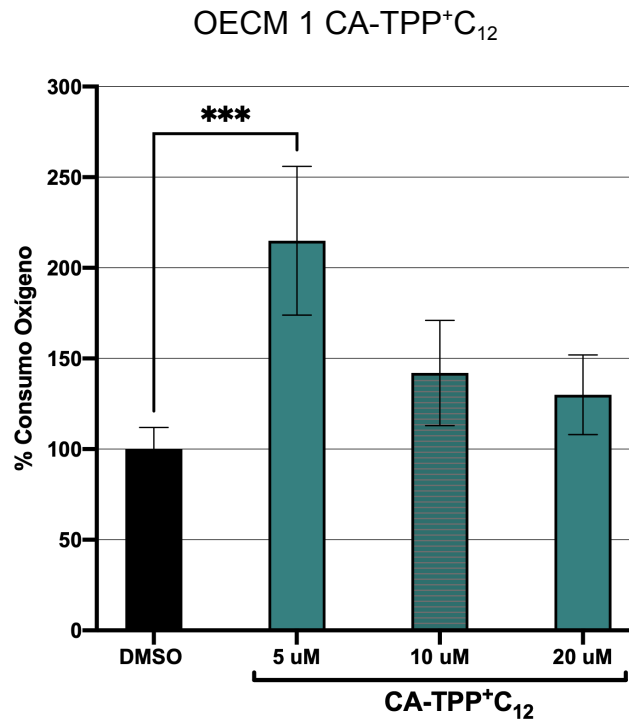


Figura 33: Relación de consumo de oxígeno en OECM 1 luego del tratamiento CA-TPP⁺C₁₂ con respecto al control negativo.

El gráfico de barras representa el porcentaje de consumo de oxígeno utilizado de las células tumorales OECM 1, luego del tratamiento con el catión lipofílico CA-TPP⁺C₁₂ utilizando como control negativo el DMSO. El promedio de velocidad de consumo de oxígeno de 5 μM es 215% (DE=41%), de 10 μM es 141% (DE=29%) y 20 μM es 130% (DE=22%). Las barras fueron obtenidas con al menos 3n de distinto día con un pasaje entre F11 a F19. ***P<0,001

DISCUSIÓN

Viabilidad celular y eficacia de los derivados del ácido cafeico en líneas celulares tumorales orales y no tumorales

La lipofilicidad es fundamental para la biodisponibilidad de un fármaco, pues si este no es capaz de atravesar membranas biológicas no podrá llegar a su sitio de acción, es por ello por lo que el ácido cafeico ha sido estudiado en cáncer predominantemente en su forma esterificada (Kuo, Y. Y y cols, 2013; Lee, Y. T y cols, 2005; Peng, C. Y y cols, 2012; Chung, L. C y cols, 2017; Kuo, Y. Y y cols, 2015; Yu, H. J. y cols, 2017; Alam, M. y cols, 2022). Respecto al tratamiento con el derivado lipofílico CAPE en estudios *in vitro* con carcinoma oral de células escamosas en ensayos de viabilidad realizados con MTT, Kuo, Y. Y y cols bajo la hipótesis de que CAPE provoca una inhibición del crecimiento celular y la detención del ciclo celular en la fase G1, obtuvieron en su trabajo llevado a cabo con la línea celular TW 2.6 un IC_{50} para 24 horas de tratamiento de 83,8 μM ; a las 48 horas de 46,6 μM , y de 18,8 μM a las 96 horas de tratamiento (Kuo, Y. Y y cols, 2013). Siendo este último, el valor más cercano a nuestros resultados. Lee, Y. T y cols por su parte obtuvieron en las líneas celulares SAS (COCE proveniente de lengua) y OECM 1 a 24 horas un IC_{50} de $129 \pm 4,2 \mu\text{M}$ y $159,2 \pm 7,2 \mu\text{M}$ respectivamente. A su vez, ellos trabajaron con fibroblastos obtenidos de muestras orales, y hallaron que CAPE no tiene efecto citotóxico hasta 100 μM (Lee, Y. T y cols, 2005). Peng, C. Y y cols, en su estudio determinaron si CAPE a concentraciones no citotóxicas atenuaban la migración e invasión celular, estableciendo que en la línea celular SCC-9 (COCE proveniente de lengua) no hay efecto sobre la viabilidad celular con concentraciones entre [0-40 μM] a las 24 y 48 horas (Peng, C. Y y cols, 2012). Chung, L. C y cols, también trabajaron tanto con OECM 1, como con SAS (TW04), y mediante el ensayo de viabilidad celular CyQuant encontraron que con 30 μM se inhibe el crecimiento celular entre un 25% y 22% (Chung, L. C y cols, 2017). De manera que, podemos establecer que los derivados lipofílicos de ácido cafeico efectivamente presentan mayor potencia en el tratamiento de COCE en líneas celulares resistentes [0,5-3 μM] y no resistentes a cisplatino [10-15 μM].

La discrepancia entre las concentraciones inhibitorias medias se debe a la focalización mitocondrial, donde TPP⁺ en efecto es capaz de dirigir el ácido cafeico al interior de las células, para luego estos cationes lipofílicos de ácido cafeico ser secuestrados por la matriz mitocondrial. Conviene destacar que TPP⁺ ha demostrado ser una molécula segura para su uso en humanos en estudios realizados con el antioxidante MitoQ (Zielonka, J. y cols, 2017); sin embargo, tiene actividad biológica sobre la OXPHOS a través de la inhibición de la cadena respiratoria y la disminución del potencial de membrana mitocondrial, con una correlación entre el largo de cadena y su eficacia (Trnka, J. y cols, 2015; Reyli, C. y cols, 2013). Respecto a la inhibición de la OXPHOS, tiene efectos perjudiciales sólo en condiciones donde el metabolismo y eliminación de fármacos se encuentra al mínimo, lo que es poco probable de que ocurra en condiciones que no sean experimentales (Reyli, C. y cols, 2013), es por ello y con miras hacia el futuro que se deberá tener en consideración si se desea utilizar esta molécula en conjunto con Cisplatino o posterior a él, puesto que es conocido su efecto adverso de nefrotoxicidad (Ghosh, S., 2019; Crona, D. J. y cols, 2017).

Un compuesto farmacóforo que ha sido acoplado con TPP⁺ en los mismos largos de cadena alifática utilizados en este trabajo es el ácido gálico (fig. 34) (Jara, J. A. y cols, 2014).

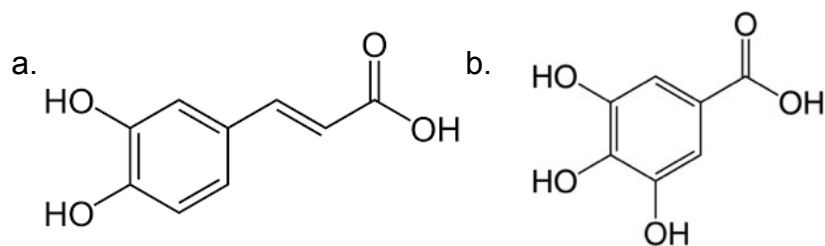


Figura 34: Comparación de las estructuras químicas entre el a. ácido gálico y b. ácido cafeico.

Jara, J. A. y cols analizaron el efecto del ácido gálico unido a trifenílfosfonio, con los mismos largos de cadena alifático con los que trabajamos nosotros, en

células de adenocarcinoma mamario de ratón no resistentes y resistentes a quimioterapia, y en leucemia humana. Obtuvieron valores de IC_{50} en un rango de concentraciones entre $[0,38 \pm 0,02 \mu\text{M} - 34,6 \pm 0,02 \mu\text{M}]$. Al comparar, ambos farmacóforos coinciden en que TPP^+C_8 es el compuesto menos citotóxico. Por el contrario, $GA-TPP^+C_{10}$ resultó ser el más potente en las líneas celulares tumorales y TPP^+C_{12} en líneas tumorales y no tumorales, en cambio, en este trabajo el largo de cadena de diez carbonos resultó ser el más citotóxico para los fibroblastos, y el largo de doce carbonos el más citotóxico en las líneas celulares tumorales. Si bien $CA-TPP^+C_{12}$ no fue el más potente en CAL 27, si lo fue en OECM 1, y dado que las concentraciones de esta última son mayores es la que se utilizaría para futuras investigaciones. Por lo tanto, las diferencias en el comportamiento de estos compuestos se deben probablemente al grupo farmacóforo.

Referente al tratamiento en líneas tumorales orales con cationes lipofílicos deslocalizados de ácido cafeico, actualmente solo existe un trabajo de investigación no publicado perteneciente a este laboratorio en el que probaron $CA-TPP^+C_8$ y $CA-TPP^+C_{10}$ en CAL 27 donde obtuvieron concentraciones de IC_{50} a 48 horas de tratamiento de $1,6 \pm 0,5 \mu\text{M}$ en TPP^+C_8 y $0,9 \pm 0,7 \mu\text{M}$ en TPP^+C_{10} (Escobar, B y cols, 2020), mientras que en este estudio obtuvimos un IC_{50} en la misma línea celular de $2,9 \pm 1,48 \mu\text{M}$ y $1,98 \pm 0,4 \mu\text{M}$, por consiguiente los resultados son coincidentes debido a que se encuentran dentro del mismo rango de magnitud, y ambos coinciden en que $CA-TPP^+C_8$ es menos potente que $CA-TPP^+C_{10}$.

Dado que los resultados de CAL 27 se repiten en dos estudios, sería interesante realizar un ensayo en combinación de $CA-TPP^+$ junto a cisplatino con la finalidad de evaluar si estos compuestos presentan un efecto sinérgico o aditivo entre sí, ya que una disminución de concentraciones en el tratamiento con cisplatino podría significar disminuir sus efectos adversos (nefrotoxicidad, mucositis) permitiendo al paciente una mejor calidad de vida futura.

Li, J. y cols el año 2017 trabajaron sintetizando derivados de los ácidos hidroxicinámicos: p-cumárico (p-CoA), cafeico (CaA) (fig.35), ferúlico (FA) y ácido

cinámico (CA) que conjugaron con el catión trifenilfosfonio (Li, J. y cols, 2017). Para evaluar viabilidad celular utilizaron el método Sulforhodamina B (SRB) que estima el número de células indirectamente midiendo el contenido total de proteínas, el fundamento de utilizar esta técnica se basa en que previamente evaluaron cómo se reducían los niveles de peróxido de hidrógeno, y determinaron que los MitoCaA, MitoFA y MitoCoA aumentaron significativamente las actividades de enzimas antioxidantes (GSH-P y CAT) (Li, J. y cols, 2017), por lo que los MitoHCA al dirigirse a la mitocondria interfieren con el ensayo MTT, el que como se menciona en la metodología se basa en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT), por parte de las oxidorreductasas mitocondriales y extramitocondriales por parte de las células metabólicamente activas (reacción autolimitada).

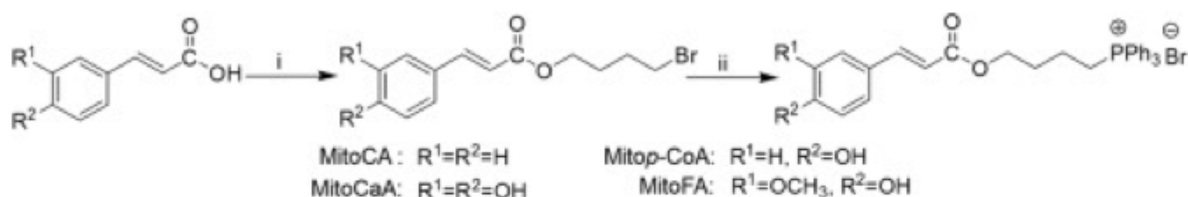


Figura 35: Estructuras químicas MitoHCA de Li, J., y cols.

Por tanto, Li, J. y cols evaluaron la actividad antiproliferativa tras el tratamiento a 24 horas y 48 horas con los MitoHCA y el ácido cafeico (CaA) en carcinoma hepatocelular (Hep G2) y en dos líneas celulares normales: L02 células hepáticas humanas y WI38 fibroblastos humanos diploides, a continuación se expresa una tabla resumida solo con los resultados de MitoCaA y CaA (tabla 7):

Tabla 7: Valores de IC₅₀ obtenidos por Li, J. y cols en líneas celulares de hepatocarcinoma y células hepáticas con ácido cafeico y MitoCaA.

	Hep G2		L02		WI38
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas
CaA	200,89 ± 3,88	92,97 ± 1,35	402,95 ± 18,87	156,14 ± 3,88	280,89 ± 9,47
MitoCaA	9,19 ± 0,25	5,96 ± 0,21	118,68 ± 0,93	66,83 ± 3,49	123,57 ± 6,92

Fragmento extraído de Li, J. y cols, synthesis of hydroxycinnamic acid derivatives as mitochondria-targeted antioxidants and cytotoxic agents.

Se aprecia que los valores del rango de selectividad hacia las células tumorales de HepG2 se encuentran dentro de los valores obtenidos para carcinoma espinocelular oral, sin embargo, los resultados de Li, J. y cols muestran una menor sensibilidad del MitoCaA hacia las células no tumorales (Li, J. y cols, 2017). Estos resultados contrastan con los nuestros, puesto que los cationes lipofílicos de ácido cafeico con los que trabajamos tenían valores IC_{50} similares a los obtenidos por las células tumorales. En este punto, es importante mencionar que Li, J. y cols, 2017 no indican cuál fue el pasaje celular utilizado para su experimento, sin embargo, los pasajes celulares de fibroblastos en este trabajo fueron cuatro, cinco y seis, considerados más susceptibles.

Lograr selectividad de los quimioterápicos es fundamental para reducir los efectos adversos que estos provocan. En este trabajo calculamos el índice de selectividad entre fibroblastos y carcinoma oral de células escamosas resistente (CAL 27) y no resistente a cisplatino (OECM 1). Los compuestos lograron una mayor selectividad en células tumorales, a excepción de CA-TPP⁺C₁₀ en OECM 1. Del mismo modo, aunque son estudios preliminares los derivados del ácido cafeico mostraron mayor selectividad hacia las células resistentes a cisplatino con valores desde menor a mayor largo de cadena alifática de 4,97; 4,94; 20,7 y 7,54 (tabla 6), respectivamente. Escobar, B., y cols calcularon el índice de selectividad utilizando células de displasia oral humana (DOK) y CAL 27 donde obtuvieron valores de IC_{50} a 48 horas tratamiento en CA-TPP⁺C₈ 3,9 y en CA-TPP⁺C₁₀ 10,9 (Escobar, B., y cols, 2020), resultados que si bien coinciden en mostrar selectividad, estos contrastan con los nuestros, puesto que TPP⁺C₈ y TPP⁺C₁₀ no presentan diferencias significativas en su selectividad. En suma, entre CAL 27 y OECM 1 el que tuvo mayor selectividad fue CA-TPP⁺C₁₂ con un IS de 7,54 y 1,09.

Li, J. y cols en carcinoma hepatocelular obtuvieron un índice de selectividad con ácido cafeico de 2,01 a las 24 horas de tratamiento y de 1,68 a las 48 horas, resultados que se asimilan a los nuestros; y con su MitoCaA obtuvieron 12,91 y 11,21 a 24 horas y 48 horas de tratamiento, respectivamente (Li, J. y cols, 2017). Resulta relevante evaluar si las diferencias obtenidas en los valores de actividad citotóxica se deben a las diferencias en el ensayo utilizado en este trabajo.

Por contraparte, con el compuesto antes mencionado utilizado por Jara, J. A. y cols de ácido gálico unido a TPP⁺ el largo de cadena alifática con doce carbonos fue el menos selectivo de los 4 utilizados, se debe poner en claro que este utilizó células de ratón y un farmacóforo distinto (Jara, J. A. y cols, 2014), por lo que, compararlo sirve nuevamente para poner en manifiesto que a un mismo largo de cadena el farmacóforo incide en la citotoxicidad, asimismo, son líneas celulares tumorales y especies de origen diferentes.

En cuanto a la selectividad del fenetil éster de ácido cafeico Lee, Y. T. y cols trataron fibroblastos provenientes de muestreos orales, y tuvieron un índice de selectividad a las 24 horas con OECM-1 de 1,01 y con SAS de 1,34 (Lee, Y. T. y cols, 2005), resultados que se encuentran contenidos dentro de nuestros valores para OECM-1, que van desde 1,02; 1,08 y 1,09 en TPP⁺C₈, TPP⁺C₁₁ y TPP⁺C₁₂. Podemos apreciar que ambos compuestos tienen una selectividad similar por las células tumorales; sin embargo, los cationes lipofílicos de ácido cafeico son más potentes porque requieren de concentraciones menores que varían en 50 unidades respecto del CAPE.

Adicionalmente, el año 2017 se investigó el uso de derivados del ácido cafeico unido trifenilfosfonio para de desarrollar antioxidantes mitocondriotrópicos. Teixeira, J. y cols unió el ácido cafeico mediante el enlace amida al trifenilfosfonio (fig. 35), del que luego sintetizó múltiples compuestos que denominó AntiOxCIN. Sus ensayos se basaron en caracterizar la actividad antioxidante del primer compuesto mencionado, los AntiOxCIN y el ácido cafeico. Determinaron que las propiedades antioxidantes del compuesto 1 y del ácido cafeico, no fueron tan efectivas como las de los AntiOxCIN, por lo que no evaluaron citotoxicidad en células sanas (Teixeira, J. y cols, 2017). Sobre las diferencias entre el compuesto 1 de Teixeira, J. y cols, además del grupo que utilizó para unir ambas moléculas, también encontramos que los derivados de ácido cafeico utilizados en este trabajo poseen un mayor largo de cadena, y por tanto, mayor lipofilicidad.

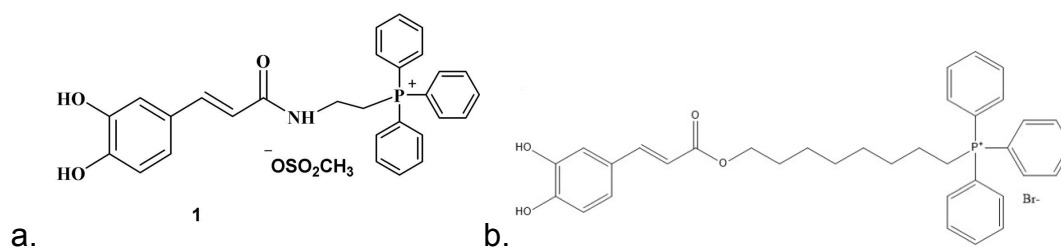


Figura 36: Comparación de las estructuras químicas entre el a. Compuesto 1 y b. CA-TPP⁺C₈. El Compuesto 1 lleva el nombre por ser así denominado por Teixeira, J. y cols, en el estudio en que lo sintetizaron.

El ácido cafeico en células tumorales tuvo en efecto citotóxico a 200 μM disminuyendo la viabilidad entre un 40% y 20% aproximadamente. No fue posible establecer el IC_{50} sin embargo, en base a nuestros resultados estimamos que se encuentra $> 200 \mu\text{M}$.

Si se analiza el gráfico de ácido cafeico en ambas líneas celulares tumorales se aprecia que previo a la disminución de la viabilidad hubo un aumento de esta, lo que nos indica que a bajas concentraciones tiene un comportamiento no citotóxico. Este aumento de la viabilidad previo ocurrido antes de la disminución de la viabilidad se puede explicar por el efecto antioxidante del ácido cafeico, ya que la producción de ROS tiene un rol en el desarrollo de los tumores, siendo la interrupción del equilibrio redox una de las razones descritas que subyacen el desarrollo del cáncer (Srinivas, U. S. y cols, 2019; Aggarwal, V. y cols, 2019).

Respecto al tratamiento con ácido cafeico en células no tumorales se observa que a ninguna concentración de las utilizadas existe un efecto citotóxico, es más, desde la mínima concentración (1 μM) hay un aumento en viabilidad celular. Estos resultados se condicen con la literatura, puesto que se ha descrito que los antioxidantes tienen la capacidad de bloquear la apoptosis de manera similar a como lo hacen los inhibidores de la caspasa, sustentado en que en los modelos de apoptosis se ha observado que la célula se encuentra en un entorno más oxidante antes de la fase final de activación de las caspasas. El mecanismo de acción antioxidante para ácido cafeico descrito por Bastidas, H. y cols señala como efecto primario la neutralización directa de los radicales libres mediante la donación de protones de los grupos hidroxilos (OH) para formar compuestos

estables que no puedan producir daño oxidativo a las estructuras celulares, y secundariamente, actuando en la quelación de metales de transición que catalizan la descomposición de H_2O_2 en radical hidroxilo (OH^\cdot).

Por lo tanto, el carácter citotóxico del ácido cafeico en células no tumorales se debe a la unión con un grupo lipofílico, demostrado en este estudio con CA-TPP⁺ y en la literatura con CAPE. Sin embargo, no es posible utilizar el ácido cafeico por sí solo, puesto que su biodisponibilidad es bastante reducida, lo que quiere decir que no se alcanza a acumular la suficiente cantidad de compuesto al interior de la célula para ejercer efecto (Teixeira, J. y cols, 2017), necesitando utilizar concentraciones para lograr un efecto que no son compatibles con la realidad clínica.

A su vez, la potencia de los derivados lipofílicos pareciera tener una relación dependiente del tiempo de tratamiento en CAL 27, resultados que se condicen a los obtenidos por Escobar, B. y cols (ver anexo 5). En OECM 1 los resultados nos indican que el IC_{50} entre 24 y 48 horas de tratamiento con CA-TPP⁺C₁₀ parece ser similar, y que CA-TPP⁺C₁₁ junto a CA-TPP⁺C₁₂ son más potentes con menor tiempo de tratamiento.

Efecto de derivados del ácido cafeico sobre la función mitocondrial en líneas celulares tumorales de carcinoma oral de células escamosas

Bajo la hipótesis de que los cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico, dada su estructura química, se dirigen selectivamente hacia las mitocondrias de las células cancerosas interviniendo en su función, es que decidimos partir investigando si la muerte celular que ocasionan los CA-TPP⁺ se encuentra relacionada con algún efecto que pueda ocurrir en la OXPHOS.

Como se mencionó con anterioridad, la OXPHOS ocurre por la oxidación de los sustratos en la cadena respiratoria, que genera energía a través de la fuerza

protón-motriz que impulsa la síntesis de ATP (ATP sintasa), el que almacena esta energía a través de sus enlaces químicos, por lo tanto, estos procesos se encuentran acoplados. Es decir, que si se utiliza un inhibidor de la cadena respiratoria de igual modo se bloquea la síntesis de ATP puesto que no existe energía para que la ATP sintasa fosforile el ADP en ATP, ya que no están ingresando espontáneamente los protones desde el exterior a través de su subunidad F_0 hacia la matriz mitocondrial. Y en el caso de inhibidores de la síntesis de ATP, también se bloquea la transferencia de electrones, por consiguiente, tampoco consume oxígeno; lo que sucede ya que la cadena respiratoria continuará bombeando protones hacia el exterior, pero no habrá vía de retorno de estos hacia el interior de la matriz mitocondrial, por lo que llegado cierto punto el coste energético en contra de este gradiente será igual o superior a la energía liberada por la transferencia de electrones desde el NADH al O_2 , momento en el que el flujo de electrones se detiene porque el sistema estará en equilibrio.

A consecuencia, como primer ensayo evaluamos el contenido de ATP intracelular luego de 24 horas de tratamiento, del que obtuvimos que en las dos líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas a ninguna concentración [0,25 μ M a 30 μ M] hubo efecto sobre la síntesis de ATP. El ATP se mantuvo proporcional a la cantidad de células vivas, luego de verificarlo con el análisis estadístico.

Escobar, B. y cols también determinaron los niveles de ATP intracelular mediante kit CellTiter-Glo® pero con 4 horas de tratamiento con los compuestos CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ en la línea celular HEp-2 que corresponde a carcinoma epidermoide de laringe humana, utilizando de control el ensayo de incorporación de PI (yoduro de propidio) para visualizar la integridad celular, trabajó con las siguientes concentraciones 5 μ M - 10 μ M - 20 μ M - 30 μ M - 50 μ M. Obtuvieron que en ambos compuestos hay una correlación entre la caída del ATP y la constante de muerte celular a partir de la concentración 20 μ M, o sea, los resultados obtenidos en el rango de concentraciones entre 5 μ M - 10 μ M dan cuenta de una real caída del ATP inducida por CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ sin producir muerte celular. Las diferencias en la disminución del ATP en el rango de 5 μ M - 10 μ M

entre el trabajo de Escobar, B., y cols y este, es primero el origen de las líneas celulares de carcinoma epidermoide (larínge versus tejidos orales), y segundo, el tiempo de tratamiento (4 horas versus 24 horas).

De estos resultados, podemos conjeturar tres escenarios. El primero es que los CA-TPP⁺ no afectan ningún componente de la OXPHOS, y su mecanismo de acción va por otra vía. Segundo, que si inhibe ya sea, la cadena transportadora de electrones o la ATP sintasa, la variación del contenido de ATP intracelular no se vea reflejada por mecanismos compensatorios. Y tercero, que estos cationes lipofílicos de ácido cafeico tengan una acción desacoplante entre la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa, es decir, que aumenten la velocidad del transporte de electrones sin la producción de ATP. Precisar, que para hacer la distinción entre si una molécula tiene un efecto sobre la inhibición de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa, o si tiene un efecto desacoplante entre estos 2 complejos proteínicos, se deberá determinar experimentalmente por separado el funcionamiento de cada uno. Puesto que si se evalúan en conjunto, en ambos casos se verá una inhibición de la OXPHOS. Recordar que el perfil metabólico remodelado de las células cancerosas les permite adaptarse para sobrevivir en ambientes hostiles (Missiroli, S. y cols, 2020), y que dependiendo del caso, utilizan la glicólisis o OXPHOS para sus procesos bioenergéticos y biosintéticos según lo requieran.

Como segundo ensayo, con el fin de determinar si la cadena transportadora de electrones es afectada por acción de los cationes lipofílicos, realizamos una medición del consumo de oxígeno inmediatamente después de la aplicación de los compuestos. Dado que la línea celular OECM 1 no resistente a cisplatino utiliza una mayor concentración de compuesto para ejercer el efecto del 50%, y por lo tanto, serían las concentraciones que se utilicen en ensayos posteriores, es que sólo se realizó la medición con estas. Se encontró que para todas las concentraciones [5 μ M- 30 μ M] hay un aumento del consumo de oxígeno, sin importar el largo de cadena.

Como observamos anteriormente, existe una relación de proporción entre las concentraciones utilizadas y la viabilidad celular (a mayor concentración, mayor muerte celular/ menor viabilidad celular) con OECM 1 en los cuatro largos de cadena. Sin embargo, contemplando que la viabilidad celular y el consumo de oxígeno son experimentos distintos que miden cosas distintas, resulta interesante que no haya una correlación por ejemplo, entre menor viabilidad celular y mayor consumo de oxígeno o viceversa, en ninguno de los cuatro cationes de ácido cafeico.

Con estos resultados podemos suponer que según lo que Bastidas, H. y cols indican sobre que los cationes lipofílicos de ácido cafeico ejercen una perturbación sobre la carga negativa de la matriz mitocondrial estaría en lo correcto, y sería este efecto el que explicaría el aumento del consumo de oxígeno con el fin de sostener la diferencia del potencial electronegativo de membrana de la matriz mitocondrial de las células cancerosas, y mantener las funciones de la mitocondria (Bastidas, H. y cols, 2022). Lo que nos lleva, en consecuencia a especular que dado que los ROS son moléculas generadas gracias a la propiedad del O_2 de aceptar electrones individuales que forman derivados inestables, durante proceso en que el O_2 ejerce la función de aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones, es que sería la alta generación de ROS lo que provoca un daño oxidativo extenso, y desencadena la muerte de las células tumorales, por el daño oxidativo en el ADN, ARN, proteínas, lípidos y mitocondrias. Precizando como contexto en que, las células tumorales expresan altos niveles de proteínas antioxidantes para prevenir la acumulación de ROS y posiblemente impulsar a las células cancerosas hacia un estado proliferativo, evitando la muerte celular regulada por la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) impulsada por ROS (Missiroli, S. y cols, 2020), ya que existe una compleja diafonía entre los ROS y la progresión del cáncer. Este es el mecanismo que podría explicar el efecto citotóxico del ácido cafeico pasado cierto punto de concentración. Evidentemente hacen falta más estudios para corroborar estas hipótesis, sin embargo, este trabajo nos ha permitido direccionar la investigación futura sobre a qué apuntar respecto del mecanismo de acción.

Como complemento de trabajos de investigación y a la hipótesis antes dicha, es de mencionar que Escobar, B., y cols también midió el potencial de membrana luego 30 minutos de tratamiento con CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ en CAL 27 y HEP-2, y determinó la producción de ROS mitocondrial tras 24 horas de tratamiento en HEP-2. De ellos estableció, que tanto en CAL 27 como en HEP-2 hubo una disminución del potencial de membrana $\Delta\Psi_m$, en CAL 27 esta disminución fue abrupta, siendo inclusive menor que el control positivo FCCP (desacoplante de la función mitocondrial). Los resultados de la medición de la producción de ROS, mostraron que CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ en carcinoma epidermoide de laringe HEP-2, indujeron un aumento de la producción de ROS mitocondrial significativa sin alterar la masa mitocondrial a las concentraciones 0,5 μM - 1 μM - 5 μM .

Por otro lado, Li, J. y cols, 2017 quienes no realizaron los mismos experimentos, sin embargo, si caracterizaron el comportamiento de su MitoCaA obtuvieron en células de carcinoma hepatocelular este compuesto provoca la fragmentación mitocondrial luego de 4 horas de tratamiento a concentración 20 $\mu\text{mol/L}$ resultando en una morfología en forma de dona y una red discontinua de mitocondrias, donde bajo las mismas condiciones el MitoCaA no causó daño mitocondrial en la línea hepática humana L02. También obtuvieron que MitoCaA desencadenó la muerte celular apoptótica de forma dosis dependiente y que hubo participación del mPTP en la muerte celular de HepG2 inducida por MitoCaA. Respecto a la inducción de disfunción mitocondrial, Li, J. y cols indican que hubo una hinchazón de gran amplitud en la matriz mitocondrial, donde sus compuestos MitoHCA tuvieron una interacción sinérgica con Ca²⁺ para inducir la apertura de mPTP; a su vez, evaluaron si la apertura del mPTP alteraba el potencial de membrana mitocondrial, y obtuvieron que a 10 μM - 20 μM los MitoCaA promovieron una disminución transitoria del potencial de membrana mitocondrial.

CONCLUSIONES

Los cationes lipofílicos de ácido cafeico tienen mayor potencia que el fenetil éster de ácido cafeico y el ácido cafeico en estudios *in vitro* de carcinoma oral de células escamosas.

El ácido cafeico *in vitro* no tiene efecto citotóxico en ninguna de las concentraciones evaluadas sobre las células no tumorales.

El tratamiento con cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico en CAL 27 es tiempo y dosis dependiente, en cambio, en OECM 1 según las condiciones experimentales de este trabajo sólo es dosis dependiente.

Los cationes lipofílicos de ácido cafeico en la condiciones evaluadas no inhibieron la producción de ATP.

En OECM 1 hay un aumento del consumo de oxígeno con los cuatro cationes lipofílicos, lo que podría corresponder a un efecto desacoplante, sin embargo no se evidenció un efecto sobre la concentración intracelular de ATP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alam, M., Ashraf, G. M., Sheikh, K., Khan, A., Ali, S., Ansari, M. M., Adnan, M., Pasupuleti, V. R., & Hassan, M. I. (2022). Potential Therapeutic Implications of Caffeic Acid in Cancer Signaling: Past, Present, and Future. *Frontiers in pharmacology*, *13*, 845871.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.845871>

Aggarwal, V., Tuli, H. S., Varol, A., Thakral, F., Yerer, M. B., y cols (2019). Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules*, *9*(11), 735.

<https://doi.org/10.3390/biom9110735>

Bastidas, H., Araya-Valdés, G., Cortés, G., Jara, J. A., Catalán, M. (2022). Pharmacological Effects of Caffeic Acid and Its Derivatives in Cancer: New Targeted Compounds for the Mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology*, *1401*, 213–225.

https://doi.org/10.1007/5584_2022_718

Bórquez P., Capdeville F., Madrid A., Veloso M., Cárcamo M. (2011). Sobrevida global y por estadios de 137 pacientes con cáncer intraoral: Experiencia del Instituto Nacional del Cáncer. *Revista chilena de cirugía*, *63*(4), 351-355.

<https://dx.doi.org/10.4067/S0718-40262011000400003>

Botham K.M., y Mayes P.A. (2022). La cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa. Rodwell V.W., Bender D.A., Botham K.M., Kennelly P.J., Weil P(Eds.), Harper. *Bioquímica ilustrada*, 32e. McGraw Hill.

<https://accessmedicina-mhmedical-com.uchile.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=3284§ionid=273199464>

Bugshan, A., y Farooq, I. (2020). Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. *F1000Research*, *9*, 229.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.22941.1>

Burke P. J. (2017). Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. *Trends in cancer*, *3*(12), 857–870.

<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.006>

Candia J., Fernández A., Somarriva C., Horna-Campos O. (2018). Mortalidad por cáncer oral en Chile, 2002-2012. *Revista médica de Chile*, *146*(4), 487-493.

<https://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872018000400487>

Cerea, S., Sansoni, M., Scarzello, G., Groff, E., Ghisi, M. (2022). Psychological variables associated with quality of life in patients with head and neck cancer: the role of body image distress. *Supportive care in cancer: official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 30(11), 9127–9139. <https://doi.org/10.1007/s00520-022-07334-6>

Chamoli, A., Gosavi, A. S., Shirwadkar, U. P., Wangdale, K. V., Behera, S. K., y cols. (2021). Overview of oral cavity squamous cell carcinoma: Risk factors, mechanisms, and diagnostics. *Oral oncology*, 121, 105451. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105451>

Clark J.W., y Longo D.L. (2022). *Biología de la célula cancerosa*. Loscalzo J, Fauci A., Kasper D., Hauser S., Longo D., Jameson J.,(Eds.), Harrison. Principios de Medicina Interna, 21e. McGraw Hill. <https://accessmedicina-mhmedical-com.uchile.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=3118§ionid=267820496>

El-Naggar A. K., Chan J. K. C., Grandis J. R., Takata T., Slootweg P. J. (2017). WHO Classification of Head and Neck Tumors (4th edition). Capítulo 4: Tumours of the oral cavity and mobile tongue (pág 105-131) y Capítulo 5: Tumours of the Oropharynx (pág 133-145)

Escobar Ramírez, B. Jara, J. A., Catalán, M. (2020). Evaluación de la actividad citotóxica de nuevos cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico en células de cáncer de cabeza y cuello. Estudio *in vitro*. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
Observación no publicada.

Espíndola, K. M. M., Ferreira, R. G., Narvaez, L. E. M., Silva Rosario, A. C. R., da Silva, y cols (2019). Chemical and Pharmacological Aspects of Caffeic Acid and Its Activity in Hepatocarcinoma. *Frontiers in oncology*, 9, 541. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>

Farthing P. M., & Speight P. M. (2018). Educational aspects of oral cancer. *British dental journal*, 225(9), 875–878. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.925>

Friedland C. J. (2019). Head and Neck Cancer: Identifying Depression as a Comorbidity Among Patients. *Clinical journal of oncology nursing*, 23(1), 99–102. <https://doi.org/10.1188/19.CJON.99-102>

Gabusi, A., Gissi, D. B., Montebugnoli, L., Asioli, S., Tarsitano, A., y cols. (2020). Prognostic impact of intra-field heterogeneity in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 476(4), 585–595. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02656-z>

Gabusi, A., Gissi, D. B., Tarsitano, A., Asioli, S., Marchetti, C., y cols (2018) Intratumoral heterogeneity in recurrent metastatic squamous cell carcinoma of the oral cavity: new perspectives afforded by multiregion DNA sequencing and mtDNA analysis. *J Oral Maxillofac Surg* 77:440– 455. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.09.014>

Ganesh D., Sreenivasan P., Öhman J., Wallström M., Braz-Silva P. H. y cols. (2018). Potentially Malignant Oral Disorders and Cancer Transformation. *Anticancer research*, 38(6), 3223–3229. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12587>

García Moreno M. E., Salmerón Valdés E. N., Lara Carrillo E., Hernández Morales A., Velázquez Enríquez U., y cols. (2021). Carcinoma oral de células escamosas, gravedad del diagnóstico tardío: reporte de caso y revisión de la literatura. *CIENCIA ergo-sum*, 28(3). <https://doi.org/10.30878/ces.v28n3a7>

Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., y cols. (2007). Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(10), 777–789. <https://doi.org/10.1093/jnci/djk179>

Howard A., Agrawal N., Gooi Z. (2021). Lip and Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Hematology/oncology clinics of North America*, 35(5), 895–911. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2021.05.003>

International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2020: All Cancers: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/39-All-cancers-fact-sheet.pdf>. (Recuperado 20 octubre 2022).

International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2020: Estimated number of new cases in 2020, Chile, both sexes, all ages (excl. NMSC) https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=152&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=

1#collapse-group-0-1
(Recuperado 20 octubre 2022)

Instituto de Salud Pública. (2015). Folleto de Información al profesional Gardasil 9 Vacuna Nonavalente Antivirus Papiloma Humano Recombinante Adsorbida, suspensión inyectable. REF.: RF670995/15. REG. ISP N° B-2554/15
https://www.ispch.cl/sites/default/files/gardasil_9.pdf

Jamal-Hanjani, M., Quezada, S. A., Larkin, J., Swanton, C. (2015). Translational implications of tumor heterogeneity. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(6), 1258–1266.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1429>

Iwasa J, & Marshall W(Eds.), (2020). Respiración aeróbica y la mitocondria. *Biología Celular y Molecular. Conceptos y experimentos*, 8e. McGraw Hill.
<https://accessmedicina-mhmedical-com.uchile.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=2817§ionid=239338474>

Jara, J. A., Castro-Castillo, V., Saavedra-Olavarría, J., Peredo, L., Pavanni, M., y cols. (2014). Antiproliferative and uncoupling effects of delocalized, lipophilic, cationic gallic acid derivatives on cancer cell lines. Validation in vivo in syngenic mice. *Journal of medicinal chemistry*, 57(6), 2440–2454.
<https://doi.org/10.1021/jm500174v>

Johnson, D. E., Burtness, B., Leemans, C. R., Lui, V., Bauman, J. E., y Grandis, J. R. (2020). Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 92.
<https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>

Kalyanaraman, B., Cheng, G., Hardy, M., Ouari, O., Lopez, M., y cols. (2018). A review of the basics of mitochondrial bioenergetics, metabolism, and related signaling pathways in cancer cells: Therapeutic targeting of tumor mitochondria with lipophilic cationic compounds. *Redox biology*, 14, 316–327.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.020>

Kerawala, C., Roques, T., Jeannon, J. P., y Bisase, B. (2016). Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *The Journal of laryngology and otology*, 130(S2), S83–S89.
<https://doi.org/10.1017/S0022215116000499>

Kim, G. G., Lee, J. Y., Choi, P. S., Kim, S. W., Park, J. H. (2020). Tumor Targeting Effect of Triphenylphosphonium Cations and Folic Acid Coated with Zr-89-Labeled Silica Nanoparticles. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12), 2922.

<https://doi.org/10.3390/molecules25122922>

Kouketsu, A., Sato, I., Abe, S., Oikawa, M., Shimizu, Y., y cols (2016). Detection of human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: a cohort study of Japanese patients. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 45(8), 565–572.

<https://doi.org/10.1111/jop.12416>

Kuo, Y. Y., Lin, H. P., Huo, C., Su, L. C., Yang, J., y cols. (2013). Caffeic acid phenethyl ester suppresses proliferation and survival of TW2.6 human oral cancer cells via inhibition of Akt signaling. *International journal of molecular sciences*, 14(5), 8801–8817. <https://doi.org/10.3390/ijms14058801>

Kuo, Y. Y., Jim, W. T., Su, L. C., Chung, C. J., Lin, C. Y., y cols. (2015). Caffeic Acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 10748–10766. <https://doi.org/10.3390/ijms160510748>

Lee, Y. T., Don, M. J., Hung, P. S., Shen, Y. C., Lo, Y. S., y cols. (2005). Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer letters*, 223(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.09.048>

Levitzky M, & McDonough K.H. (2013). Ejercicio. Raff H, Levitzky M(Eds.), *Fisiología médica. Un enfoque por aparatos y sistemas*. McGraw Hill.

<https://accessmedicina-mhmedical-com.uchile.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=1501§ionid=101810225>

Lewandowska A. M., Rudzki M., Rudzki S., Lewandowski T., Laskowska B. (2019). Environmental risk factors for cancer - review paper. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*, 26(1), 1–7.

<https://doi.org/10.26444/aaem/94299>

Li, J., He, D., Wang, B., Zhang, L., Li, K., Xie, Q., Zheng, L. (2017). Synthesis of hydroxycinnamic acid derivatives as mitochondria-targeted antioxidants and cytotoxic agents. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 7(1), 106–115.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.05.002>

Machiels, J. P., René Leemans, C., Golusinski, W., Grau, C., Licitra, L., y cols. (2020). Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 31(11), 1462–1475.

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.011>

Maraboli-Contreras S., Adorno-Farias D., Maturana-Ramirez A., Rojas-Alcayaga, G., Fuentes-Alburquenque M., y cols. (2018). Sobrevida de carcinoma oral de células escamosas: reporte de la Universidad de Chile. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 11(3), 147-151. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072018000300147>

Mirzaei, S., Gholami, M. H., Zabolian, A., Saleki, H., Farahani, M. V., y cols. (2021). Caffeic acid and its derivatives as potential modulators of oncogenic molecular pathways: New hope in the fight against cancer. *Pharmacological research*, 171, 105759. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105759>

Missiroli, S., Perrone, M., Genovese, I., Pinton, P., Giorgi, C. (2020). Cancer metabolism and mitochondria: Finding novel mechanisms to fight tumours. *EBioMedicine*, 59, 102943. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102943>

Morales A., Jara G., Werlinger F., Cabello R., Espinoza I. y cols (2020). Sinopsis de la Situación de Salud Oral en Chile - Parte II: Diagnósticos Poblacionales de Salud Oral.. *International journal of interdisciplinary dentistry*, 13(2), 88-94. <https://dx.doi.org/10.4067/S2452-55882020000200088>

Mrak, E., Fessler, J., & Smith, C. (1935). Caffeic acid in prunes and its behavior as a laxative principle. *Science (New York, N.Y.)*, 82(2126), 304. <https://doi.org/10.1126/science.82.2126.304>

Mroz, E. A., Patel, K. B., Rocco, J. W. (2020). Intratumor heterogeneity could inform the use and type of postoperative adjuvant therapy in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 126(9), 1895–1904. <https://doi.org/10.1002/cncr.32742>

Mroz, E. A., Tward, A. D., Hammon, R. J., Ren, Y., Rocco, J. W. (2015). Intra-tumor genetic heterogeneity and mortality in head and neck cancer: analysis of data from the Cancer Genome Atlas. *PLoS medicine*, 12(2), e1001786. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001786>

Nelson, D. L., Cuchillo Foix, C. M., Lehninger, A. L., Cox, M. M. (2015). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (6a. ed.). Barcelona: Omega

Noh, J. K., Woo, S. R., Kong, M., Lee, M. K., Lee, J. W., y cols. (2023). Gene signature predicting recurrence in oral squamous cell carcinoma is characterized

by increased oxidative phosphorylation. *Molecular oncology*, 17(1), 134–149. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13328>

Ojeda, D., Huber, M. A., Kerr, A. R. (2020). Oral Potentially Malignant Disorders and Oral Cavity Cancer. *Dermatologic clinics*, 38(4), 507–521. <https://doi.org/10.1016/j.det.2020.05.011>

Osazuwa-Peters, N., Simpson, M. C., Zhao, L., Boakye, E. A., Olomukoro, S. I., y cols. (2018). Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer*, 124(20), 4072–4079. <https://doi.org/10.1002/cncr.31675>

Oshimori N. (2020). Cancer stem cells and their niche in the progression of squamous cell carcinoma. *Cancer science*, 111(11), 3985–3992. <https://doi.org/10.1111/cas.14639>

Pelinson, L. P., Assmann, C. E., Palma, T. V., da Cruz, I. B. M., Pillat, M. M., Mânica, A., y cols. (2019). Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. *Molecular biology reports*, 46(2), 2085–2092. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04658-1>

Pennacchiotti G., Sáez R., Martínez M., Cárcamo M., Montes R. (2016). Prevalencia del Virus Papiloma Humano en Pacientes con diagnóstico de Carcinoma Oral de Células Escamoso de la Cavidad Oral. *Revista chilena de cirugía*, 68(2), 137-142. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-40262016000200005>

Peng, C. Y., Yang, H. W., Chu, Y. H., Chang, Y. C., Hsieh, M. J., y cols. (2012). Caffeic Acid phenethyl ester inhibits oral cancer cell metastasis by regulating matrix metalloproteinase-2 and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2012, 732578. <https://doi.org/10.1155/2012/732578>

Peredo-Silva, L., Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Pavani, M., Maya, J. D., y cols. (2017). Derivatives of alkyl gallate triphenylphosphonium exhibit antitumor activity in a syngeneic murine model of mammary adenocarcinoma. *Toxicology and applied pharmacology*, 329, 334–346. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.06.017>

Ramirez V., Vásquez-Rozas P., Ramírez-Eyraud P. (2015). Mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile, años 2002-2010. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 8(2), 133-138.

<https://dx.doi.org/10.1016/j.piro.2015.02.015>

Ramón Y Cajal, S., Sesé, M., Capdevila, C., Aasen, T., De Mattos-Arruda, L., y cols. (2020). Clinical implications of intratumor heterogeneity: challenges and opportunities. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 98(2),161–177. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01874-2>

Sandoval-Acuña, C., Fuentes-Retamal, S., Guzmán-Rivera, D., Peredo-Silva, L., Madrid-Rojas, M., y cols. (2016). Destabilization of mitochondrial functions as a target against breast cancer progression: Role of TPP(+)-linked-polyhydroxybenzoates. *Toxicology and applied pharmacology*, 309, 2–14.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.08.018>

Santander, S., Escobar, P.,Gonzalez, P. (2022). Plan Nacional del Cáncer 2022-2027, basado en plan nacional del cáncer 2018-2028 – Ministerio de Salud: Santiago de Chile.

<https://leydelcancer.minsal.cl/documentos/Marco-general-del-Plan-Nacional-de-Cancer-2022-2027.pdf>

Smith, J. D., Shuman, A. G., Riba, M. B. (2017). Psychosocial Issues in Patients with Head and Neck Cancer: an Updated Review with a Focus on Clinical Interventions. *Current psychiatry reports*, 19(9), 56.

<https://doi.org/10.1007/s11920-017-0811-9>

Speight, P. M., y Farthing, P. M. (2018). The pathology of oral cancer. *British dental journal*, 225(9), 841–847.

<https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.926>

Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*, 25, 101084.

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018aggarwal.101084>

Skorecki K.L., & Cohen B.H. (2022). Dna mitocondrial: rasgos hereditarios y enfermedades relacionadas. Loscalzo J, & Fauci A, & Kasper D, & Hauser S, & Longo D, & Jameson J(Eds.), Harrison. Principios de Medicina Interna, 21e. McGraw Hill.

<https://accessmedicina-mhmedical-com.uchile.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=3118§ionid=267808012>

Teixeira, J., Cagide, F., Benfeito, S., Soares, P., Garrido, J., y cols. (2017). Development of a Mitochondriotropic Antioxidant Based on Caffeic Acid: Proof of Concept on Cellular and Mitochondrial Oxidative Stress Models. *Journal of medicinal chemistry*, 60(16), 7084–7098.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00741>

Thomson P. J. (2018). Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 47(9), 803–807.
<https://doi.org/10.1111/jop.12733>

Vaupel, P., Schmidberger, H., Mayer, A. (2019). The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International journal of radiation biology*, 95(7), 912–919.
<https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589653>

Vitório J. G., Duarte-Andrade F. F., Dos Santos Fontes Pereira T., Fonseca F. P., Amorim L. S. D., y cols.(2020). Metabolic landscape of oral squamous cell carcinoma. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 16(10), 105.
<https://doi.org/10.1007/s11306-020-01727-6>

Wang, J. Y., Li, J. Q., Xiao, Y. M., Fu, B., Qin, Z. H. (2020). Triphenylphosphonium (TPP)-Based Antioxidants: A New Perspective on Antioxidant Design. *ChemMedChem*, 15(5), 404–410. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900695>

Warnakulasuriya, S., y Kerr, A. R. (2021). Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future. *Journal of dental research*, 100(12), 1313–1320.
<https://doi.org/10.1177/00220345211014795>

Warnakulasuriya, S., Kujan, O., Aguirre-Urizar, J. M., Bagan, J. V., González-Moles, M. Á., y cols. (2021). Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral diseases*, 27(8), 1862–1880.
<https://doi.org/10.1111/odi.13704>

Wattenberg, L. W., Coccia, J. B., Lam, L. K. (1980). Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. *Cancer research*, 40(8 Pt 1), 2820–2823.

Wong T., y Wiesenfeld D. (2018). Oral Cancer. *Australian dental journal*, 63 Suppl 1, S91–S99.
<https://doi.org/10.1111/adj.12594>

Yin W., Wang, J., Jiang, L., James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells.

Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 246(16), 1791–1801.
<https://doi.org/10.1177/15353702211005390>

Yu, H. J., Shin, J. A., Yang, I. H., Won, D. H., Ahn, C. H., y cols. (2017). Apoptosis induced by caffeic acid phenethyl ester in human oral cancer cell lines: Involvement of Puma and Bax activation. *Archives of oral biology*, 84, 94–99.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.024>

Zenga J, y Harris M.S. (2021). Otorrinolaringología: cirugía de cabeza y cuello. Doherty G.M.(Ed.), Diagnóstico y tratamiento quirúrgicos, 15e. McGraw Hill.
<https://accessmedicina-mhmedical-com.uchile.idm.oclc.org/content.aspx?bookid=3076§ionid=259189677>

Zielonka, J., Joseph, J., Sikora, A., Hardy, M., Ouari, O., y cols. (2017). Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chemical reviews*, 117(15), 10043–10120.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>

ANEXOS

Anexo 1: Definiciones de los trastornos orales potencialmente malignos (OPMD) obtenidas del taller convocado en marzo 2020 por el Centro Colaborador de la OMS para el Cáncer Oral en el Reino Unido.

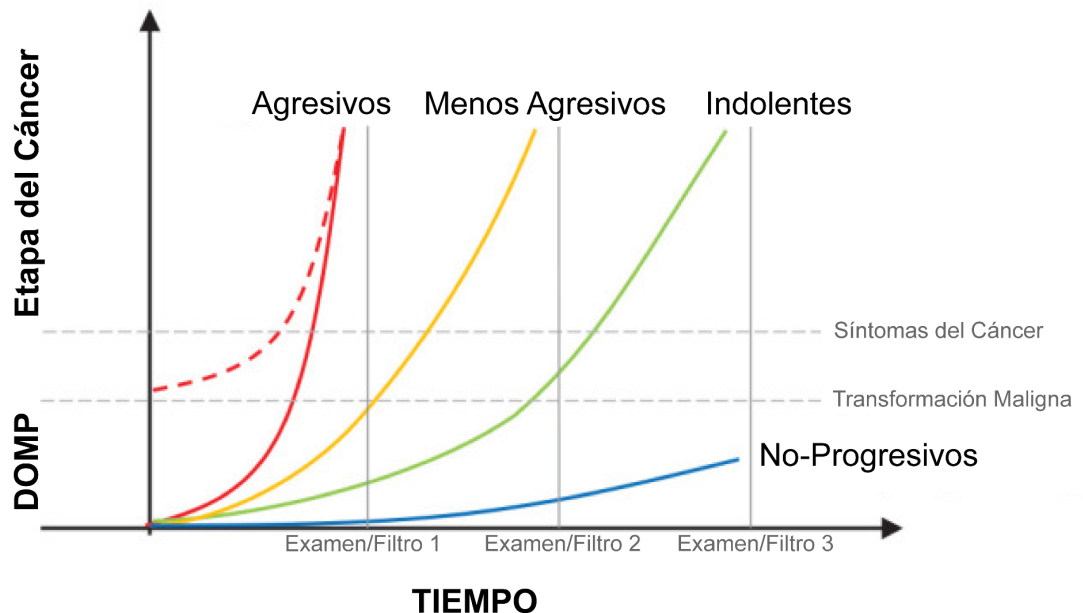
Definiciones recomendadas para los OPMD

Desorden	Definición	Fuente
Leucoplasia	Una placa predominantemente blanca de riesgo cuestionable que ha excluido (otras) enfermedades o trastornos conocidos que no conllevan un mayor riesgo de cáncer.	Warnakulasuriya, S. y cols, 2007
Leucoplasia verrugosa proliferativa (PVL)	Trastorno progresivo, persistente e irreversible caracterizado por la presencia de leucoplasia múltiple que con frecuencia se convierte en verrugosa.	WHO Collaborating Centre, 2020
Eritroplasia	Una mancha predominantemente rojo fuego que no se puede caracterizar clínica o patológicamente como ninguna otra enfermedad definible.	WHO Collaborating Centre, 2007
Fibrosis Submucosa Oral (OSF)	Una enfermedad crónica e insidiosa que afecta la mucosa oral, inicialmente resulta en la pérdida de fibroelasticidad de la lámina propia y, a medida que avanza la enfermedad, resulta en fibrosis de la lámina propia y la submucosa de la cavidad oral junto con atrofia epitelial.	Modificado de: World Workshop on Oral Medicine V, Kerr y cols. (2011)
Liquen Plano Oral (OLP)	Trastorno inflamatorio crónico de etiología desconocida con recaídas y remisiones características, que presenta lesiones reticulares blancas, acompañadas o no de áreas atróficas, erosivas y ulcerativas y/o tipo placa. Las lesiones suelen ser bilateralmente simétricas. La gingivitis descamativa puede ser una característica.	WHO Collaborating Centre, 2020
Queratosis Actínica (Queilitis Actínica) (AK/AC)	Un trastorno que resulta del daño solar y afecta las áreas expuestas de los labios, más comúnmente el borde bermellón del labio inferior con una presentación variable de áreas atróficas y erosivas y placas blancas.	WHO Collaborating Centre, 2020
Lesiones Palatinas en Fumadores Inversos	Manchas blancas y/o rojas que afectan el paladar duro en fumadores inversos, frecuentemente teñidas con nicotina.	WHO Collaborating Centre, 2020
Lupus Eritematoso	Una enfermedad autoinmune del tejido conectivo que puede afectar el labio y la cavidad oral, donde	WHO Collaborating

Oral (OLE)	se presenta como un área eritematosa rodeada de estrías blanquecinas, frecuentemente con una configuración en diana.	Centre, 2020
Disqueratosis Congénita (DC)	Un síndrome de insuficiencia de la médula ósea hereditario poco frecuente y propenso a preocupaciones causado por un telómero aberrante. Se caracteriza clínicamente por la presencia de la tríada diagnóstica de uñas displásicas, pigmentación cutánea reticular en encaje y leucoplasia oral.	Ballew y Savage, 2013
Recién incluido en la clasificación 2020		
Lesión Liquenoide Oral (OLL)	Lesiones bucales con características liquenoides pero que carecen del aspecto clínico o histopatológico típico del LPO, es decir, pueden presentar asimetría o son reacciones a restauraciones o cuidados dentales inducidos por fármacos.	WHO Collaborating Centre, 2020
Enfermedad de Injerto contra Huésped Oral (OGVHD)	Presentaciones clínicas e histopatológicas similares al liquen plano oral en un paciente que desarrolló una complicación multiorgánica autoinmune después de un trasplante alogénico de células hematopoyéticas.	WHO Collaborating Centre, 2020
Eliminado de la Clasificación 2020 debido a la evidencia limitada		
Epidermolisis Ampollosa Oral (OEB)	Varios trastornos de fragilidad epidérmica asociados con formación de ampollas inducidas por traumatismos, cicatrización progresiva de los tejidos blandos y aumento del riesgo de cáncer epidérmico.	Fritsch y cols, 2008

Traducido de: Table 1 Recommended definitions for OPMDs, extraído de Warnakulasuriya, S., Kujan, O., Aguirre-Urizar, J. M., Bagan, J. V., González-Moles, y cols. (2021). Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral diseases*, 27(8), 1862–1880. <https://doi.org/10.1111/odi.13704>

Anexo 2: Imagen de complemento sobre el sesgo de duración del carcinoma oral de células escamosas.



Se representan cuatro escenarios diferentes.

- Los COCE "agresivos" de la cavidad oral pueden surgir de novo (línea roja discontinua) o desarrollarse a partir de OPMD. Progresan rápidamente (de ahí la curva pronunciada) y es poco probable que se detecten en un estado asintomático durante la detección.
- Los carcinomas orales de células escamosas (COCE) "menos agresivos" pueden desarrollarse a partir de los OPMD. Progresan con menos rapidez (por lo tanto, la curva es menos pronunciada) y pueden detectarse como COCE asintomáticos durante la detección.
- Los COCE "indolentes" se desarrollan a partir de OPMD más antiguos. Progresan lentamente (de ahí la curva más plana) pero finalmente se transforman.
- Los OPMD "no progresivos" nunca se transforman. Estos escenarios representan un sesgo de tiempo prolongado: los pacientes con COCE agresivos tienen una ventana de detección potencial corta y es menos probable que sean capturados por un programa de detección.

Los pacientes con COCE de crecimiento más lento tienen una ventana de detección potencial más prolongada y es más probable que se detecten cuando están asintomáticos. Como resultado, se encontró una mayor proporción de COCE de crecimiento más lento en el grupo examinado, lo que provoca una mejora aparente en la supervivencia. Adaptado de Figure 1. Extraído de Warnakulasuriya, S., y Kerr, A. R. (2021). Oral Cancer Screening: Past, Present, and Future. *Journal of dental research*, 100(12), 1313–1320. <https://doi.org/10.1177/00220345211014795>

Anexo 3: Establecimientos que entregan servicio de radioterapia y terapia sistémica (quimioterapia) distribuidos a lo largo del país (*anexo 3*).

Tabla 19. Establecimientos de radioterapia según complejidad y servicio de salud

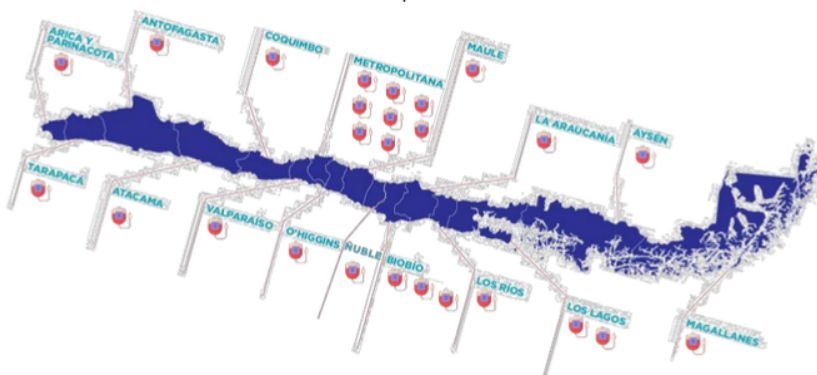
Complejidad Radioterapia	en	Establecimiento	Servicio de salud	Macrorregión
Alta Complejidad		Centro oncológico del Norte	Antofagasta	Norte
		Hospital Carlos Van Buren, Valparaíso.	Valparaíso	Centro norte
		Instituto Nacional del Cáncer, Región Metropolitana	Metropolitano Norte	Centro
		Hospital Base de Valdivia, Valdivia	Valdivia	Extremo Sur
Complejos		Hospital Cesar Garavagno, Talca	Maule	Centro sur
		Hospital Guillermo Grant Benavente	Concepción	Sur
Estándar		Hospital Clínico de Magallanes	Magallanes	Extremo Sur

Fuente: Elaboración propia, Departamento GES y Redes de alta complejidad, DIGERA, MINSAL

Figura 160. Establecimientos que entregan prestaciones de teleterapia y braquiterapia de adultos en la red pública según complejidad, Chile, noviembre 2021



Figura 158. Establecimientos que entregan prestaciones de terapia sistémica para tumores sólidos de adultos en la red pública.

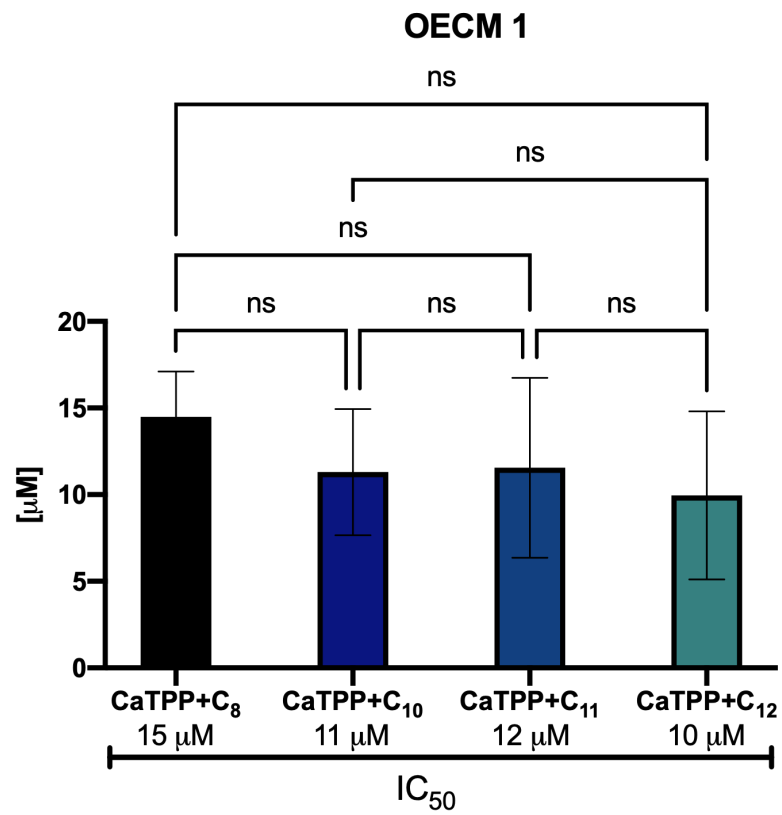


Fuente: Elaboración propia, Departamento GES y Redes de alta complejidad, DIGERA, MINSAL

Figura 158, 160. Tabla 19. Extraído de Santander, S., Escobar, P., Gonzalez, P. (2022). Plan Nacional del Cáncer 2022-2027, basado en plan nacional del cáncer 2018-2028 – Ministerio de Salud: Santiago de Chile.

<https://leydelcancer.minsal.cl/documentos/Marco-general-del-Plan-Nacional-de-Cancer-2022-2027.pdf>

Anexo 4: Comparación estadística de los IC_{50} obtenidos tras el tratamiento con los cuatro cationes lipofílicos de ácido cafeico estudiados, en la línea celular OECM 1.



Se observa que los valores de IC_{50} no tienen una diferencia estadísticamente significativa entre sí.

Anexo 5: Citotoxicidad de los compuestos CA-TPP+ sobre las líneas celulares CAL 27, HEp2 y DOK obtenidas por Escobar, B. y cols, 2020.

Tabla 1. Citotoxicidad de los compuestos CA-TPP+ sobre líneas celulares Cal 27, HEp2 y DOK. IC₅₀ = concentración que resulta en la citotoxicidad del 50% después de 24/48/72 h. Los valores representan los valores promedios ± desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Cada experimento fue hecho en triplicado.

Valores de IC₅₀ (μM) para CA-TPP+ en células de cáncer de cabeza y cuello.

Compuestos	24 hrs		48 hrs			72 hrs	
	Cal 27	HEp-2	Cal 27	HEp-2	DOK	Cal 27	HEp-2
CA-TPP+C ₈	4,6 ± 0,5	11,6 ± 0,4	1,6 ± 0,5 ^{*****a}	4,3 ± 0,02 ^{*****a}	6,39 ± 0,3	0,94 ± 0,01 ^{*****}	2,0 ± 0,04 ^{*****}
CA-TPP+C ₁₀	6,2 ± 0,4 ^b	8,4 ± 0,7 ^b	0,9 ± 0,2 ^{*****a}	2,6 ± 0,1 ^{*****ab}	9,9 ± 0,1	0,68 ± 0,06 ^{*****}	1,3 ± 0,01 ^{*****}
CA-TPP+C ₁₁	N/D	4,4 ± 0,1	N/D	2,8 ± 0,04	4,16 ± 0,4	N/D	0,5 ± 0,1
CA-TPP+C ₁₂	N/D	4,7 ± 0,5	N/D	2,7 ± 0,03	3,86 ± 1,1	N/D	0,5 ± 0,1

Nota. * p< 0,05 ** p< 0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001 indican diferencias significativas entre tiempos de exposición en las líneas celulares para cada compuesto. El valor de p fue calculado usando el análisis de la varianza bidireccional (ANOVA).

^a indica diferencia significativa (p<0,0001) entre línea celular tumoral y línea celular DOK para cada compuesto.

^b indica diferencia significativa (p<0,001) entre compuestos en línea celular tumoral a los mismos tiempos de exposición.

N/D: no determinado.

Tabla 1. Extraído de Escobar Ramírez, B. Jara, J. A., Catalán, M. (2020). Evaluación de la actividad citotóxica de nuevos cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico en células de cáncer de cabeza y cuello. Estudio *in vitro*. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Observación no publicada.