



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“Evaluación de la actividad citotóxica de nuevos cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico en células de cáncer de cabeza y cuello. Estudio *in vitro*”

Bastían Escobar Ramírez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANODENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

José Antonio Jara
Instituto de Ciencias Odontológicas (ICOD)

TUTORES ASOCIADOS

Mabel Catalán
ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile

Adscrito a Proyecto Fondecyt iniciación nº11180533

y nº11160281 (MCD)

Santiago, Chile 2020



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

**“Evaluación de la actividad citotóxica de nuevos cationes lipofílicos
derivados del ácido cafeico en células de cáncer de cabeza y cuello.
Estudio *in vitro*”**

Bastián Escobar Ramírez

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANODENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

José Antonio Jara

Instituto de Ciencias Odontológicas (ICOD)

TUTORES ASOCIADOS

Mabel Catalán

ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile

**Adscrito a Proyecto Fondecyt iniciación n°11180533
y n°11160281 (MCD)**

Santiago, Chile 2020

-El Psy-Congroo-

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer enormemente a mis tutores el Dr. José Jara y la Dra. Mabel Catalán por haberme dado la oportunidad de ser su tesista. Claramente no fue un año fácil, es por eso por lo que no saben lo agradecido que estoy por el apoyo y todo lo que aprendido con ustedes.

Me gustaría agradecer a todas esas personas que aportaron algo en este camino. Ya sean mis compañeros de laboratorio tanto en la facultad de odontología como en medicina. Como también a mis amigos que conocí durante mi formación de pregrado y a las personas que se han sumado a mi vida en el último tiempo.

Agradecido de mi familia, por el apoyo y animo entregado estando conmigo en los buenos y en los malos.

Finalmente, agradecer a “La Pandillita” y si llegan a leer esto quiero que sepan que son y serán una gran parte de mí.

¡Gracias!

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología del cáncer de cabeza y cuello.....	1
1.2 Tratamiento convencional para el cáncer cabeza-cuello.....	2
1.3 Heterogeneidad tumoral.....	3
1.4 Metabolismo energético tumoral.....	5
1.5 Mitocondria como blanco farmacológico.....	6
1.6 Nuevas moléculas derivadas de cationes lipofílicos deslocalizados.....	8
1.7 Derivados del ácido cafeico como agente antineoplásico.....	10
2. HIPOTESIS	12
3. OBJETIVO GENERAL	12
4. OBJETIVOS ESPECIFICOS	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1 Compuestos.....	13
5.2 Reactivos.....	13
5.3 Líneas y cultivos celulares.....	14
5.4 Ensayo de viabilidad celular.....	14
5.5 Medición del potencial transmembrana mitocondrial.....	15
5.6 Determinación de los niveles de ATP.....	15
5.7 Determinación de la producción de ROS mitocondrial.....	16
5.8 Análisis estadístico.....	16
6. RESULTADOS	18
7. DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIÓN	48
9. REFERENCIAS	49

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura química de los cationes lipofílicos derivados del CA.	17
Figura 2	Viabilidad celular en línea celular Cal 27 posterior a incubación con cationes lipofílicos derivados de CA.	20
Figura 3	Viabilidad celular en línea celular HEp-2 posterior a incubación con cationes lipofílicos derivados de CA.	21
Figura 4	Determinación del $\Delta\Psi_m$ en línea celular HEp-2 posterior a la incubación con cationes lipofílicos derivados del CA.	25
Figura 5	Determinación del $\Delta\Psi_m$ en línea celular Cal 27 posterior a la incubación con cationes lipofílicos derivados del CA.	25
Figura 6	Determinación de los niveles ATP en línea celular HEp-2 posterior a la incubación con CA-TPP ⁺ C ₈ .	27
Figura 7	Determinación de los niveles ATP en línea celular HEp-2 posterior a la incubación con CA-TPP ⁺ C ₁₀ .	28
Figura 8	Evaluación de la producción de ROS en línea celular HEp-2 posterior a la incubación con cationes lipofílicos derivados del CA.	30
Figura 9	Producción de ROS en línea celular HEp-2 posterior a la incubación con cationes lipofílicos derivados del CA.	31
Figura 10	Determinación de la masa mitocondrial en línea celular HEp-2 posterior a la incubación con cationes lipofílicos derivados del CA.	32

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Citotoxicidad y selectividad de los cationes lipofílicos derivados del CA en líneas celulares Cal 27, HEp-2 y DOK.	19
Tabla 2	Índice de selectividad de los cationes lipofílicos derivados del CA.	23

RESUMEN

El carcinoma espino celular de cabeza y cuello ha sido descrito como el sexto cáncer más común a nivel mundial, afectando diversas estructuras de la región maxilofacial. Dentro de estos, el carcinoma espino celular escamoso oral (COCE) es diagnosticado en estadios avanzados, afectando el pronóstico y sobrevida. Las células tumorales, incluyendo a las de cabeza y cuello tienen alteraciones metabólicas, tales como altos niveles en actividad glicolítica, crecimiento en la tasa de proliferación e invasión, quimio y radioresistencia. Sin embargo, características como un elevado potencial de transmembrana mitocondrial en estas células provee de una oportunidad de desarrollar compuestos que selectivamente sean dirigidos a la función mitocondrial de las células tumorales. En este trabajo, utilizamos nuevas moléculas derivadas del ácido cafeico (CA) con efecto citotóxico acopladas a un grupo trifenilfosfonio como vehículo mediante una cadena alquílica de distinto largo, dirigidas a las mitocondrias tumorales y mejorando su actividad antitumoral. Evaluamos la citotoxicidad, selectividad y el estrés mitocondrial de estos derivados, incluyendo efectos en la energía y comportamiento metabólico en líneas celulares de cáncer oral humano Cal 27 y HEP-2. Los cationes lipofílicos derivados del CA provocaron efecto citotóxico mostrando alta potencia y eficacia. Adicionalmente, los derivados mostraron selectividad en línea celular Cal 27. Los derivados del CA inducen estrés mitocondrial mediante disminución del potencial de transmembrana mitocondrial, reduciendo los niveles de ATP intracelular y aumentando la producción de especies reactivas del oxígeno al interior de la mitocondria en línea celular HEP-2. En conclusión, los cationes lipofílicos derivados del CA demostraron citotoxicidad selectiva ejerciendo estrés mitocondrial en las líneas celulares estudiadas. No obstante, son necesarios estudios posteriores para seguir ampliando su conocimiento de selectividad, eventuales mecanismos de acción y su efecto en modelos *in vivo*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Epidemiología del cáncer de cabeza y cuello.

Anualmente sobre 500.000 nuevos casos son reportados de carcinoma espino celular de cabeza y cuello en todo el mundo (Marur y cols., 2016). Afectando distintas estructuras de la región maxilofacial (Cohen y cols., 2018). Siendo sus factores de riesgos principalmente el hábito tabáquico y alcohol, una dieta no saludable, la falta de actividad física y un índice de masa corporal elevado. Incluso también se ha descrito la asociación con el virus del papiloma humano genotipo VPH 16 en cáncer orofaríngeo (González y cols., 2015).

Así mismo, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que el 2018 se presentaron 18.1 millones de casos nuevos de cáncer a nivel mundial, siendo esta la primera causa de muerte en personas menores de 70 años en 48 países y la segunda en 43 países. Además, se espera que para el 2040 la cifra de casos nuevos ascienda a 29.5 millones en todo el mundo (Bray y cols., 2018).

El cáncer de cabeza y cuello (CCC) está descrito como el sexto cáncer más común a nivel mundial, representa alrededor del 9% de casos nuevos por año y 90% de los casos corresponden a carcinomas de células escamosas (CCE) (Lawrence y cols., 2015). El CCC puede presentarse en el área comprendida entre la base del cráneo y las clavículas y, por lo tanto, afectar a la cavidad nasal, los senos paranasales, los labios, la cavidad oral, la faringe, las glándulas salivales y laringe (Syrjänen y cols., 2019). Sin embargo, su ubicación más común es la cavidad oral y la faringe, alterando funciones biológicas como la respiración, deglución y el habla (Alfouzan y cols., 2019).

La evidencia muestra que la mayoría de los cánceres encontrados en la cavidad oral son carcinoma espino celular escamoso (COCE) (Wong y cols., 2018). El COCE puede ubicarse en labios, dos tercios anteriores de la lengua, mucosa bucal, piso de la boca, encía, trígono retromolar y paladar duro (Santelices y cols., 2016). Siendo más común su ubicación en los dos tercios anteriores de la lengua y el piso de boca (Ettinger y cols., 2019).

La mayoría de los COCE diagnosticados en Chile se encuentran en estadios avanzados (III y IV), con compromiso local, regional y sistémico, lo que se ve reflejado en los porcentajes de sobrevida y mortalidad. En Chile, el COCE fue descrito con una tasa de mortalidad en el periodo del 2002-2010 de 1,1 y 1,25 por cada 100.000 habitantes (Ramirez y cols., 2015). A pesar de las terapias empleadas, la sobrevida está estimada en un 56,9% y 46,3% a los 5-10 años, respectivamente (Bórquez y cols., 2011).

1.2 Tratamiento convencional para el cáncer cabeza-cuello.

Las modalidades de tratamiento primario del COCE generalmente se determina según estadio de la enfermedad, pero el pilar fundamental y gold estándar de tratamiento es la cirugía (Wong y cols., 2018). Cuando los tumores son diagnosticados en estadios tempranos se tratan con cirugía, mientras que en etapa avanzada de la enfermedad se recomienda el tratamiento multidisciplinario, que incluye cirugía seguida de radioterapia adyuvante o radioterapia y quimioterapia combinadas (Yang y cols., 2019). Con respecto a la modalidad de la quimioterapia, no se ha evidenciado un beneficio como monoterapia en cáncer de cabeza y cuello (Pignon y cols., 2009). Sin embargo, existe evidencia de su beneficio como adyuvante posterior a la cirugía (Wong y cols., 2018).

El cisplatino (cis-diamminodicloroplatino; CDDP) es un compuesto derivado de platino que fue aprobado a finales del siglo XX por la FDA para el tratamiento del cáncer (Dasari y cols., 2014). Desde entonces, se utiliza como quimioterapéutico para varios tipos tumorales, entre los que destaca los cánceres que afectan el área maxilofacial, siendo eficaz y seguro en el tratamiento de pacientes adultos con cáncer oral (Feng y cols., 2019). Este compuesto se clasifica como un fármaco alquilante, que principalmente se unirán al nitrógeno de la posición 7 (N7) en las bases púricas, provocando el colapso del ADN en las células cancerosas, bloqueando la división celular y dando como resultado la muerte celular por apoptosis. Además, es capaz de interactuar con el ADN mitocondrial y múltiples proteínas en el citosol, lo que estimula estrés oxidativo y reticular (Dasari y cols., 2014; Obrist, 2018). Entre sus efectos adversos podemos encontrar náuseas, vómitos e incluso toxicidad renal. Adicionalmente, su utilización en el tratamiento del cáncer genera que las células tumorales adquieran resistencia a los efectos citotóxicos del fármaco y pueden continuar con la proliferación y la metástasis.

La evidencia de resistencia a fármacos junto a la severidad de los efectos adversos, hacen necesario la búsqueda de nuevos tratamientos que disminuyan estos factores. Es por esta razón que es necesario el desarrollo de tratamientos más efectivos, basados en los mecanismos moleculares y metabólicos que ocurren en las células tumorales (Yang y cols., 2016).

1.3 Heterogeneidad tumoral.

Dentro de los factores que determina el fracaso terapéutico y la resistencia a fármacos en las células neoplásicas a la terapia farmacológica está dada por la heterogeneidad tumoral (McGranahan y cols., 2017), esta se puede presentar entre los cánceres en diferentes pacientes (heterogeneidad inter-tumoral) como dentro de un solo tumor (heterogeneidad intra-tumoral) (Prasetyanti y cols., 2017). Desde mitad del siglo XX es que se habla de homogeneidad dentro de un tumor, y no es hasta los estudios de secuenciación de regiones tumorales que

se logra evidenciar una extraordinaria extensión en la diversidad. La diversidad se manifiesta en variaciones fenotípicas, metabólicas, mutaciones genéticas, diferente tasa de crecimiento, apoptosis, entre otras características, y diferencias metabólicas que permitirían el desarrollo de la enfermedad y la resistencia al tratamiento (Zhang y cols., 2018).

El cáncer es producto de una acumulación de mutaciones que desencadena un fenotipo maligno, es por esto por lo que la heterogeneidad estaría explicada, ya que a medida que se desarrolla el tumor los clones mutantes comienzan a expandirse y a sufrir alteraciones genéticas y epigenéticas. Junto con esto, las condiciones cambiantes del microambiente tumoral o las terapias farmacológicas utilizadas provocan que las células estén bajo una presión de selección constante (Prasetyanti y cols., 2017).

Otra explicación a la heterogeneidad estaría dada por la evolución clonal, que ocurre como resultado de la selección natural. Se plantea que los clones con mejores características se extenderían, por ejemplo, en algunas áreas del tumor se seleccionan clones que resisten a la hipoxia y en otras clones de crecimiento rápido. Los clones pueden ir variando tanto espacial como temporalmente en respuesta a estímulos endógenos y/o exógenos (Rybinski y cols., 2016). Adicionalmente, otra forma que explicaría esto, es la presencia de células madre tumorales (en inglés CSC, *cancer stem cell*). Las CSC son un subconjunto de células capaces de iniciar y mantener el crecimiento del tumor debido a su capacidad de auto-renovación y diferenciación (Ishiguro, 2017). La auto-renovación se demuestra en su capacidad de dividirse y generar progenie con características idénticas a las células progenitoras a partir de un número muy limitado de células. Por otra parte, estas células se pueden diferenciar, es decir, pueden generar cualquier subpoblación celular del tumor. Es la razón por la cual se ha propuesto que las CSC serían responsables de la iniciación, progresión, metástasis y supervivencia de un tumor. Además, se ha descrito que las CSC son inherentemente más resistentes a la quimioterapia y dirigirían la reaparición del tumor tras los tratamientos neoplásicos (Yoshida, 2015; Ishiguro, 2017).

1.4 Metabolismo energético tumoral.

La reprogramación del metabolismo energético es uno de los más importantes cambios en las células tumorales (Kalyanaraman, 2017). El aumento de la capacidad glicolítica, inclusive en presencia de oxígeno, (*“Warburg effect”*) es materia de estudio desde hace mucho tiempo. En las células normales la energía se obtiene fundamentalmente del ATP producido por la mitocondria (aprox. 90%). En las células tumorales, en cambio, mediante la producción de ácido láctico se puede proporcionar hasta el 50% del ATP requerido (Pedersen, 2007a). Estudios genómicos en 24 tipos de cáncer humanos, demuestran que la mayoría de las enzimas de la vía glicolítica se encuentran sobre expresadas (Altenberg y cols., 2004).

Para la mantención de este fenotipo preponderantemente glicolítico, el primer paso en la fosforilación de la glucosa es fundamental. La hexoquinasa (HK) es una enzima que cataliza este primer paso de la vía glicolítica, donde la glucosa es fosforilada para formar glucosa 6-fosfato (G6P). En tumores que presentan altas tasas glicolíticas, se encuentra sobre expresada una de sus isoformas de hexoquinasa distinta a la encontrada en tejidos normales, la hexoquinasa II (HK-II). Esta enzima se encuentra unida a la membrana mitocondrial externa (OMM en inglés, *outer mitochondrial membrane*) por medio de la proteína de transmembrana VDAC (en inglés, *voltage dependent anionic channel*), la cual, junto a un transportador de nucleótidos de adenina, facilitarán el acceso del ATP recién sintetizado en la membrana interna mitocondrial hacia el sitio activo de HK-II (Shoshan-Barmatz, 2017); por lo tanto, esta isoenzima tumoral es totalmente dependiente del ATP producido por el sistema mitocondrial (Pedersen, 2007b). La HK-II utiliza preferentemente el ATP y la glucosa, produciendo G6P en altas concentraciones, lo que sustenta el crecimiento mantenido del tumor. De esta manera, se provee de la materia prima para mantener la elevada proliferación de las células tumorales y asegura su supervivencia mediante la producción de ácido láctico, que al ser excretado provoca un ambiente ácido desfavorable para las células normales circundantes (Lunt y Vander Heiden, 2011).

La síntesis del ATP celular ocurre principalmente en la mitocondria. Es por ello, que la mitocondria tumoral se ha convertido en un interesante organelo a estudiar dentro de la patología del cáncer. Se han detectado diferencias asociadas específicamente a la función bioenergética de las mitocondrias en células tumorales (Kalyanaraman, 2017). Entre estas diferencias podemos encontrar: cambios en la elección de sustratos para la respiración celular, diferencia en las tasas de flujo de electrones, transporte de aniones en la capacidad de acumulación y retención de calcio. Adicionalmente, se encuentra disminuida la actividad de enzimas importantes para la fosforilación oxidativa (OXPHOS en inglés, *oxidative phosphorylation*) (Modica y cols., 2004). El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es significativamente mayor en células tumorales que en células epiteliales normales (Davis, 1985). La tasa de respiración de células tumorales es significativamente menor que la de células normales, aparentemente por la disfunción y pérdida de masa mitocondrial, lo que supone una menor cantidad de ATP disponible (Rossignol, 2004). Todas estas diferencias ofrecen distintas posibilidades para que las mitocondrias sean un buen blanco farmacológico, al momento de combatir a las células tumorales.

1.5 Mitocondria como blanco farmacológico.

La mitocondria es un organelo cuyo buen funcionamiento es primordial para el control de la vida y la muerte celular, su principal función radica en el control del metabolismo energético mediante la fosforilación oxidativa. En este organelo se encuentran las proteínas necesarias para la respiración celular, el ciclo del ácido cítrico y la β -oxidación de los ácidos grasos. Además, la mitocondria participa en el control de los niveles de calcio citosólico, la producción de ROS y la apoptosis. Los anteriores antecedentes sugieren la importancia y potencial participación de la mitocondria en enfermedades tales como el cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Armstrong, 2007). Por lo tanto, existe gran interés en diseñar fármacos dirigidos específicamente a este organelo.

Una de las cualidades aprovechable en relación con la función mitocondrial es su implicancia en el proceso de apoptosis. La permeabilización de la membrana mitocondrial supone un punto de no retorno en el proceso de muerte celular (Marchetti, 1996). Por lo tanto, compuestos que puedan favorecer la función pro-apoptótica de este organelo podrían ser usados para promover la muerte de células tumorales. La intervención en el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (ETC en inglés, *electron transport chain*) ofrece también un mecanismo para impulsar eficazmente la muerte celular. El déficit de ATP es una condición de estrés, que, mantenida en el tiempo, conduce a la muerte celular.

Las células tumorales, dada su alta tasa glicolítica, se encuentran aún más vulnerables a un posible déficit de ATP. Recordando que la HK-II, que juega un papel preponderante a la hora de mantener el fenotipo glicolítico en las células tumorales, es dependiente del ATP mitocondrial. Por lo tanto, la intervención de la ETC, principalmente en aquellas células que presentan alta actividad glicolítica, además de provocar drásticos cambios en las concentraciones citosólicas de calcio, conduciría a un profundo déficit de ATP, lo que finalmente permitiría detener el crecimiento tumoral y promover su muerte (Shoshan-Barmatz, 2017).

Al momento del planteamiento de algún agente como antitumoral, la selectividad sobre un tumor en particular es una cualidad deseada, de esta forma mejorar la eficacia antitumoral y disminuir los potenciales efectos adversos que se podrían desencadenar. En este sentido la mitocondria se podría convertir en un potencial y plausible blanco molecular para que estratégicamente se diseñen fármacos que estructuralmente permitan la acumulación en este organelo. Para estos fines la naturaleza única de la membrana interna mitocondrial (IMM, en inglés *inner mitochondria membrane*) permitiría una oportunidad para el diseño racional de nuevos fármacos. En relación con la IMM, estaría compuesta en parte por cardiolipina (CL) en el espacio intermembrana conectando ambas membranas. La CL es una clase de lípido ampliamente estudiado por ser

necesario para mantener la integridad y función de la membrana interna mitocondrial (Nakagawa, 2013). El citocromo c (hemoproteína esencial que funciona como transportador de electrones entre el complejo III y IV) estaría mayoritariamente unida a la membrana interna a través de la CL. En estas interacciones el citocromo c desempeñaría un papel en la actividad de transferencia de electrones manteniendo la molécula cerca de la cadena respiratoria (Gonzalvez y Gottlieb, 2007). Esta relación jugaría un rol importante en los cambios vistos en la IMM de células neoplásicas. Debido a esto, el $\Delta\Psi_m$ de una célula neoplásica se encontraría en el orden 150-180 mV, siendo mayor que el de cualquier otro organelo celular tanto en células tumorales como no tumorales (Modica-Napolitano y cols., 2004; Gourley, 2005), esto estaría explicado principalmente por la composición de la IMM y la impermeabilidad de está a los protones. Por lo tanto, esta condición otorga un gradiente de potencial negativo que sirve como fuerza electrostática conductora para ciertas moléculas que podrían acumularse de forma selectiva en la mitocondria de células tumorales (Coulter, 2000).

1.6 Nuevas moléculas derivadas de cationes lipofílicos deslocalizados.

Dentro del diseño racional de fármacos con tropismo mitocondrial, las estructuras químicas con mejores resultados son el uso de cationes lipofílicos deslocalizados (en inglés DLCs, *delocalized lipophilic cations*), los cuales son moléculas pequeñas cargadas positivamente que poseen estructuras electrónicas deslocalizadas a través de la estabilización de la resonancia de la molécula lipofílica como el trifenilfosfonio (TPP⁺). TPP⁺ ha sido asociado a distintas estructuras con actividad biológica, dentro de los cuales han sido reportados derivados de metformina (Viostat y cols., 1995), rodamina y compuestos basados en cianina entre otros (Johnson y cols., 1980; Smiley, 1991). Estas moléculas permiten la acción de agentes bioactivos mediante la unión covalente de la molécula a través de una cadena alquílica. Por lo general, las moléculas cargadas no pueden atravesar las membranas lipídicas, si no es con la ayuda de una proteína transportadora, debido a la gran energía de activación requerida para remover las moléculas de agua asociadas. La

distribución de la carga positiva sobre la extensa superficie lipofílica de estos cationes permite disminuir considerablemente esta energía y así pueden atravesar fácilmente las membranas. El $\Delta\Psi_m$, además, favorece su acumulación en la matriz de las mitocondrias (Murphy, 2008).

El TPP⁺ como vehículo de distintos agentes activos ha permitido mejorar la acción de sondas fluorescentes, atrapadores de radicales libres (en inglés, *spin traps*) y agentes antioxidantes dirigidos tanto a mitocondrias de células aisladas como a las de organismos vivos (Ross, 2005). Adicionalmente, como agentes farmacológicos, algunos compuestos derivados de sales de TPP⁺ como por ejemplo: sales de arilfosfonio y cloruro de p-Metilbenciltrifenilfosfonio han demostrado tener capacidad antibacteriana (Bergeron, 2009) y antiparasitaria contra *T. cruzi* (Kinnamon y cols., 1977) respectivamente, además de actividad antiglicemiantes en modelos animales y actividad antiproliferativa en cultivos celulares y modelos animales (Millard y cols., 2010). También han sido descritos en el estudio en cultivos celulares de carcinoma mamario MCF-7, demostrando que este compuesto se acumula en las células malignas 30 veces más que en las células epiteliales normales (Davis, 1985). En este sentido, hace unos años se han sintetizado y probado nuevos cationes lipofílicos que han demostrado alta efectividad y selectividad. Jara y cols. (2014), en su trabajo diseñaron, sintetizaron y caracterizaron derivados del ácido gálico (GA en inglés, *gallic acid*) asociado a cadenas alifáticas de distinto largo al TPP⁺ y consecuentemente evaluados en modelos *in vitro* e *in vivo*, obteniendo mayores índices de selectividad por células tumorales. Adicionalmente, estudios en cáncer de mama (Sandoval-Acuña y cols., 2016) y en cáncer colorrectal (Jara y cols., 2020) han reportado resultados similares con los mismos compuestos en modelos *in vitro*. Estos resultados positivos han sido promisorios, sustentando la idea de acoplar compuestos con actividad citotóxica a cationes lipofílicos, con el fin de atacar el funcionamiento energético de las células neoplásicas. Además, se ha visto efecto citotóxico de los TPP⁺ derivados del GA sobre *T. cruzi* (Cortes, 2015).

1.7 Derivados del ácido cafeico como agente antineoplásico.

Los polifenoles son una mezcla compleja de compuestos que comparten estructura aromática y la presencia de uno o más grupos fenólicos. Se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos, estos pueden ser ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Quiñones y cols., 2012). Estudios han validado estos compuesto por su potencial antioxidante, antiinflamatorios e incluso su acción antitumoral (Göçer y cols., 2011). Adicionalmente, se ha visto que una dieta rica en polifenoles y flavonoides provenientes de fuentes naturales (alimentos vegetales y productos de abejas) pueden representar un estilo de vida protector, promoviendo la quimio prevención, así como mostrar una posibilidad terapéutica de estos compuestos a partir de alimentos en el tratamiento de distintas enfermedades (Grosso, 2017).

Uno de los polifenoles más estudiado en cáncer es el ácido cafeico (en inglés CA, *caffeic acid*) y sus derivados, éste es un compuesto fenólico no vitamínico que se encuentra principalmente en vegetales y frutas. Ampliamente estudiado en distintos tipos celulares tumorales, ha demostrado tener una actividad citotóxica (Serafim y cols., 2011) en distintos tipos de cáncer, provocando la activación de vías relacionadas a la apoptosis (Chen y cols., 2014) e incluso inhibiendo la migración celular en algunos tipos de cáncer (Kabala-Dzik y cols., 2017; Kabala-Dzik y cols., 2018). En esta misma línea, recientes estudios demuestran que el fenetilester del ácido cafeico; CAPE (en inglés, *caffeic acid phenethyl ester*) es un derivado de CA aislado naturalmente del propóleo de abeja; además de mostrar su actividad citotóxica, se ha reportado su inhibición del crecimiento del tumor (Chiang y cols., 2014) y potencial de generar estrés oxidativo en algunos estudios *in vitro* de cáncer (Marin y cols., 2019).

En cáncer oral, se ha demostrado del potencial de los derivados del CA, específicamente del CAPE como un potencial agente antineoplásico, promoviendo el arresto del ciclo celular e induciendo la activación de vías relacionadas a la apoptosis (Kuo y cols, 2015; Chung y cols., 2017; Yu y cols., 2017). Con todos estos antecedentes, el CA y sus derivados tienen potenciales acciones antineoplásicas. En función de estos hallazgos es que nuestro laboratorio ha diseñado y sintetizado nuevos cationes lipofílicos derivados del CA con diferentes largos de cadena alifática. El propósito de este estudio es explorar en la actividad citotóxica de estos nuevos cationes lipofílicos derivados del CA en células neoplásicas provenientes de cabeza y cuello.

2. HIPOTESIS

“Los cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico ejercen un efecto citotóxico a través de la inducción de estrés mitocondrial en células tumorales orales.”

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad citotóxica de los cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico en líneas celulares tumorales orales.

4. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Evaluar la potencia, efectividad y selectividad de los derivados del ácido cafeico en líneas celulares tumorales orales.
- b) Evaluar el estrés mitocondrial de los derivados del ácido cafeico en líneas celulares tumorales orales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Compuestos.

Los derivados del ácido cafeico trifenílfosfonio (CA-TPP⁺) fueron sintetizados previamente variando los carbonos en la cadena alifática que une la molécula de ácido cafeico con Trifenílfosfonio (TPP⁺) se muestran en la Fig.1, Bromuro de trifeníl (8-((3,4, dihidroxifenil) oxi) octil) fosfonio (CA-TPP⁺C₈), Bromuro de trifeníl (10-((3,4,-dihidroxifenil) oxi) -decil) fosfonio (CA-TPP⁺C₁₀), Bromuro de trifeníl (11-((3,4-dihidroxifenil) oxi) -undecil) fosfonio (CA-TPP⁺C₁₁), Bromuro de trifeníl (12-((3,4dihidroxifenil) oxi) -dodecil) fosfonio (CA-TPP⁺C₁₂) fueron sintetizados y caracterizados en la Facultad de Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile en colaboración con el Dr. Vicente Castro.

5.2 Reactivos.

Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco alto en glucosa (*DMEM high glucose*, código #D7777 Sigma-Aldrich®), Hidrocortisona (código #H0888 Sigma-Aldrich®), Suero fetal Bovino (FBS del inglés *Fetal Bovine Serum*, código #04-127-1A Biological Industries®), Solución Penicilina-Estreptomicina (código #03-031-1B Biological Industries®), Bicarbonato de sodio (código #S5761 Sigma-Aldrich®), DMSO (código #276855 Sigma-Aldrich®), HCl (código #AC-0065 Winkler®), NaCl (código #793566 Sigma- Aldrich®), MgCl₂ (código#M8266 Sigma-Aldrich®), CaCl₂ (código#C1016 Sigma-Aldrich®), Glucosa (código#G8272 Sigma-Aldrich®), PBS al 10X (código #16505 Merck®), Tripsina EDTA solución A (código #03-050-1B Biological Industries®), MTT (código #M6494 Thermo Fisher Scientific®), Solución azul de tripán (código #25-900-CI Corning®), *Luminescent Cell Viability Assay* (código # G7570, *CellTiter-Glo*®), MitoSOX™ Red (código #M36008, Thermo Fisher Scientific®), MitoTracker™ Green (código #M-7514, Thermo Fisher Scientific®).

5.3 Líneas y cultivos celulares.

La línea celular Cal 27 (ATCC® CRL-2095™), son células carcinoma espinocelular de células escamosas de lengua humana, resistentes a cisplatino. Línea celular HEP-2 (ATCC® CCL-23™), son células de carcinoma epidermoide de laringe humano. Fueron mantenidas en DMEM alto en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Todos los medios fueron suplementados con 1% de solución penicilina-estreptomicina y FBS al 10% y 5% respectivamente. La línea celular DOK (ECACC 94122104), células displasia oral humana como línea celular no tumoral (Chang y cols., 1992; Dong, 2015), esta línea celular fue mantenida en DMEM alto en glucosa suplementado con 10% FBS y 5 µg/ml de Hidrocortisona. Todas las líneas celulares fueron mantenidas en ambiente de 37° C y 5% CO₂.

5.4 Ensayo de viabilidad celular.

La citotoxicidad de cada compuesto se midió a través de la determinación de la viabilidad celular, lo que permitió determinar la potencia, efectividad y selectividad de estos. El efecto de cada compuesto en la viabilidad celular se evaluó mediante método colorimétrico basado en la reducción de sal tetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). Fueron cultivadas 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y luego incubadas durante 24 h. Cada pocillo fue incubado con concentraciones crecientes de los compuestos entre 0,1 y 50 µM e incubadas durante 24, 48 y 72 h. Luego se descartó el sobrenadante y se incubaron con 100 µL por pocillo de MTT 0,5 µg/ml durante 2 o 4 h. Los cristales de formazán formados fueron disueltos con 40 µL de DMSO e incubando durante 15 min a 37°C con agitación. La absorbancia fue medida mediante un lector ELISA (Bio-Rad, Hércules, CA) a 570 nm. Bajo estas condiciones, la absorbancia es directamente proporcional al número de células viables en cada pocillo.

5.5 Medición del potencial transmembrana mitocondrial.

Para la medición del $\Delta\Psi_m$ se utilizó la sonda tetrametilrodamina metil éster (en inglés TMRME, *tetramethylrhodamine methyl ester*) (Rowe y Boletta, 2013). Fueron sembradas 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 24 h. Se añadió 500 μL por pocillo de sonda TMRME 100 nM en solución en PBS, luego los pocillos fueron incubados con los compuestos a concentraciones 2,5-5-10-20 μM durante 30 min. Las células fueron expuestas a carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) como control positivo descrito como desacoplante de la respiración mitocondrial (Massalha, 2019). Después fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 3500 rpm durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 200 μL de PBS. La fluorescencia fue medida mediante citometría de flujo FACS (FACS Aria® III, BD Biosciences), usando longitud de onda excitación-emisión de 540-595 nm.

5.6 Determinación de los niveles de ATP.

Los niveles de ATP fueron medidos con el kit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. Fueron sembradas 10.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos e incubadas durante 24 hrs. Los pocillos fueron incubados con compuestos a concentraciones de 5-10-20-30-50 μM . Las células fueron expuestas a FCCP (desacoplante) y a Oligomicina (Inhibidor de la síntesis de ATP proveniente de la ATPsintasa) (Massalha, 2019), como controles positivos. Las células fueron agitadas durante 10 min e incubadas durante 4 h. Después se descartó el sobrenadante y se lavaron las células con PBS. Posteriormente se añadió 20 μL de PBS y 20 μl de buffer de lisis del kit por pocillo. La luminiscencia fue medida con un equipo lector de microplaca marca Varioskan Flash® (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Adicionalmente, para dar cuenta de la integridad de la membrana plasmática se realizó el ensayo de yoduro de propidio (PI en inglés, *propidium iodide*). Fueron sembradas 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron durante 24 h. Los pocillos fueron incubados con compuestos a concentraciones de 5-10-20-30-50 μM durante 4 h.

Después fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 3500 rpm durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 200 μ L de solución de PI. La fluorescencia fue medida mediante citometría de flujo FACS (FACS Aria® III, BD Biosciences).

5.7 Determinación de la producción de ROS mitocondrial.

La medición de especies reactivas de oxígeno (en inglés, *reactive oxygen species (ROS)*) fue mediante la incorporación de la sonda MitoSOX™ Red (Puleston, 2015). Adicionalmente, se evaluó la incorporación de la sonda MitoTracker™ Green para estudiar la variación de la masa mitocondrial (Puleston, 2015). Fueron sembradas 100.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos e incubadas durante 24 h. Los pocillos fueron incubados con compuestos con concentraciones de 0,5-1-5 μ M e incubados durante 24 h. Las células fueron expuestas a Rotenona como control positivo descrito como inhibidor del complejo I de la cadena de transportadora de electrones produciendo ROS (Massalha, 2019). Luego los pocillos fueron lavados con PBS, y se agregó 1 ml por pocillo de sonda MitoSOX™ Red 1 μ L/ml del stock (1 mM) y MitoTracker™ Green 10 μ L/ml del stock (1 mM) en CPBS (solución compuesta de PBS 1M, 0,5 mM MgCl₂, 0,7 mM CaCl₂, y 0,1% glucosa, pH 7,4) (Kauffman, 2016). Posteriormente, se incubaron con agitación durante 30 min a 37°C. Después de descartado el sobrenadante, las células se lavaron con PBS y fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 5 min. El precipitado fue resuspendido en 200 μ L de CPBS, la fluorescencia fue medida mediante citometría de flujo FACS (FACS Aria® III, BD Biosciences) a longitud de onda excitación-emisión de 510-580 y 490-516 nm para MitoSOX™ Red y MitoTracker™ Green respectivamente.

5.8 Análisis estadístico.

Para todos los experimentos, la significación estadística se estableció en $p < 0,05$. Los resultados representarán el promedio \pm SD de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism

(V5.0). Los datos se evaluaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) (con la prueba posterior de Dunett post- test) la cual se realizó para comparar los grupos experimentales con los controles.

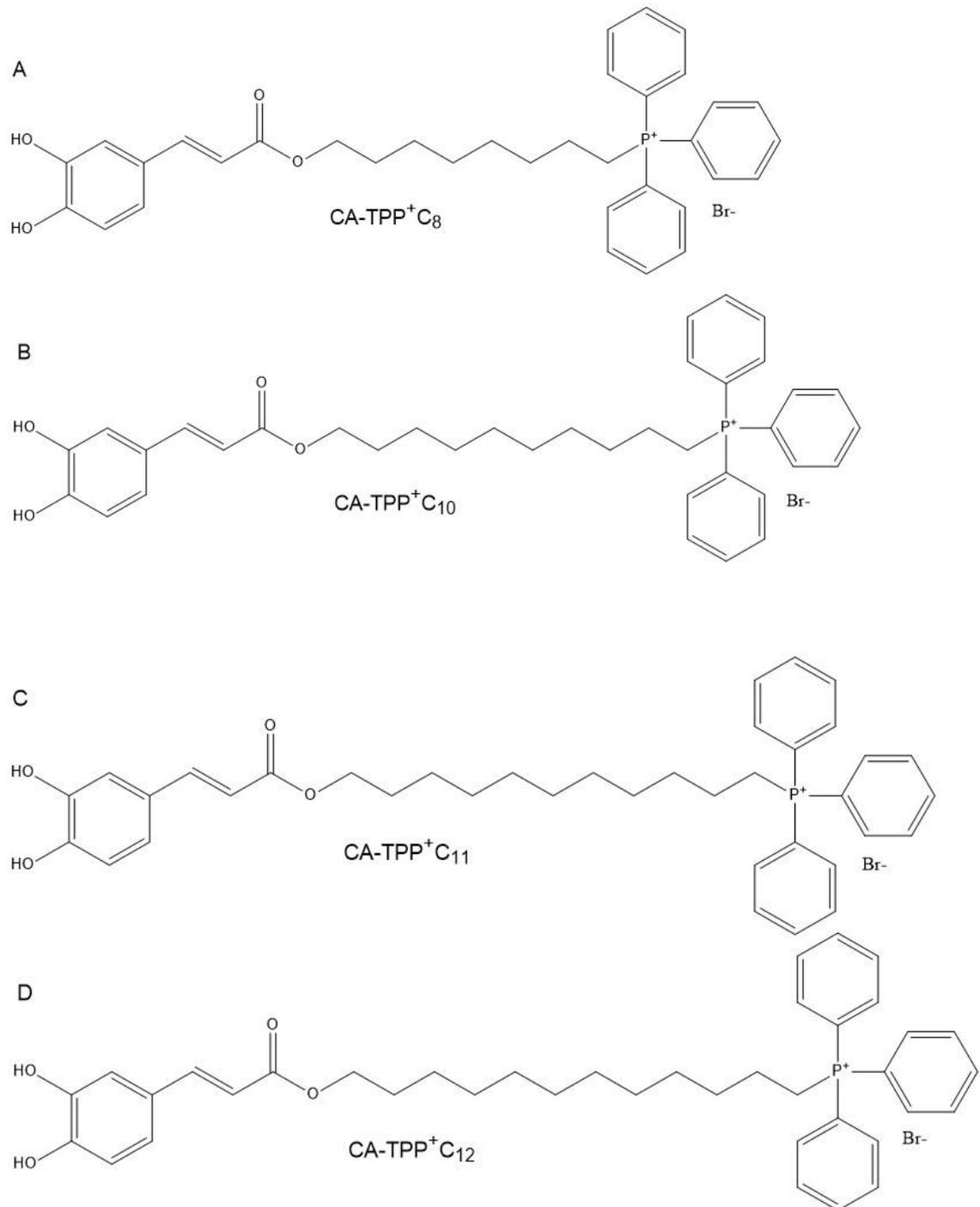


Fig. 1 Estructura química de los cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico (CA-TTP⁺). Las estructuras químicas fueron obtenidas mediante el software ChemDraw 9.0. Nuevos cafeatos unidos a catión lipofílicos deslocalizados (TTP⁺), permitiendo el tropismo mitocondrial. A) CA-TPP⁺C₈; B) CA-TPP⁺C₁₀; C) CA-TPP⁺C₁₁; D) CA-TPP⁺C₁₂.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación de la citotoxicidad de los cationes lipofílicos derivados ácido cafeico en células tumorales orales.

Se valoró la citotoxicidad de los compuestos en un rango de concentraciones entre 0,1-50 μ M durante 24, 48 y 72 h. mediante curvas de dosis-respuesta semi logarítmicas en ambas líneas celulares representadas en las Fig. 2 y 3. Las figuras 2a y 2b representan la disminución de la viabilidad en la línea celular Cal 27 tras incubación con CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀, respectivamente. Se observó que con ambos compuestos se producía disminución de la viabilidad conforme al aumento de las concentraciones ensayadas. Al estimar la concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad (IC₅₀), se distinguió que a medida que aumentaba el tiempo de exposición de las células a los compuestos, el valor de IC₅₀ disminuía (Tabla 1) aumentando la potencia con respecto a los demás (representado por el desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia la izquierda) obteniendo una mayor potencia a las 72 h. comparado con las 24 h.

Las figuras 3a, 3b, 3c y 3d representan la disminución de la viabilidad celular en línea celular HEp-2 posterior a la incorporación de CA-TPP⁺C₈, CA-TPP⁺C₁₀, CA-TPP⁺C₁₁ y CA-TPP⁺C₁₂, respectivamente. Para todos los compuestos probados, se observó una reducción de la viabilidad celular conforme al aumento de las concentraciones ensayadas; adicionalmente, se reportó un aumento de la potencia conforme a mayor tiempo de exposición (representado con el desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia la izquierda).

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 realizado en triplicado.

Compuestos	24 h.			48 h.			72 h.	
	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.

Los resultados mostraron que los compuestos de la serie probados generan un efecto citotóxico sobre ambas líneas celulares dosis dependiente; la viabilidad celular disminuyó a medida que se aumentó la concentración del compuesto administrado y también hubo un aumento de la potencia (desplazamiento de las curvas dosis-respuesta hacia la izquierda) en tiempos tardíos. Adicionalmente, todos los derivados mostraron una eficacia del 100% en ambas líneas celulares.

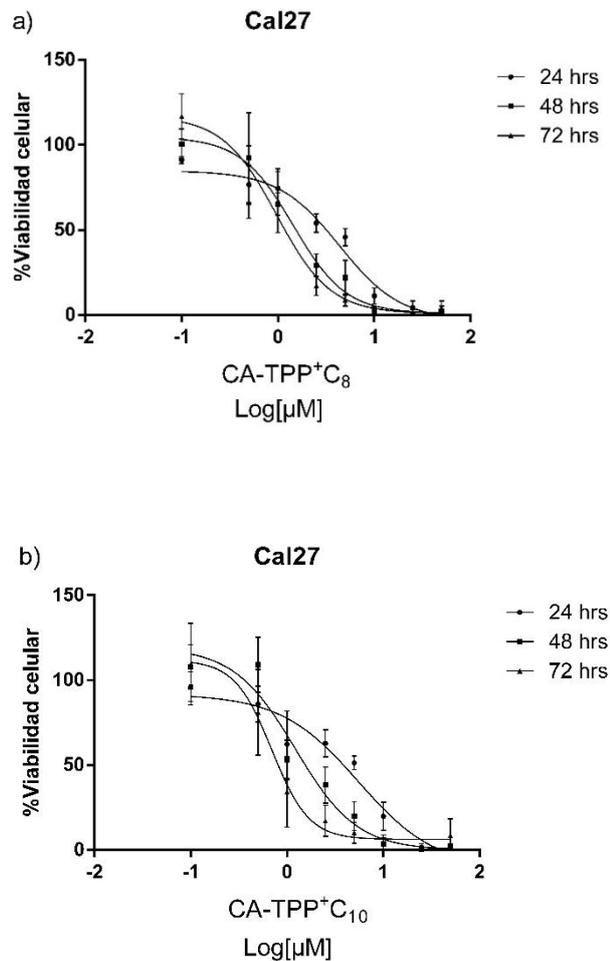


Fig. 2 Curvas de concentración del efecto en la viabilidad celular en línea celular Cal 27 tratadas con concentraciones crecientes de la serie (a) CA-TPP⁺C₈ y (b) CA-TPP⁺C₁₀ durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan los valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado.

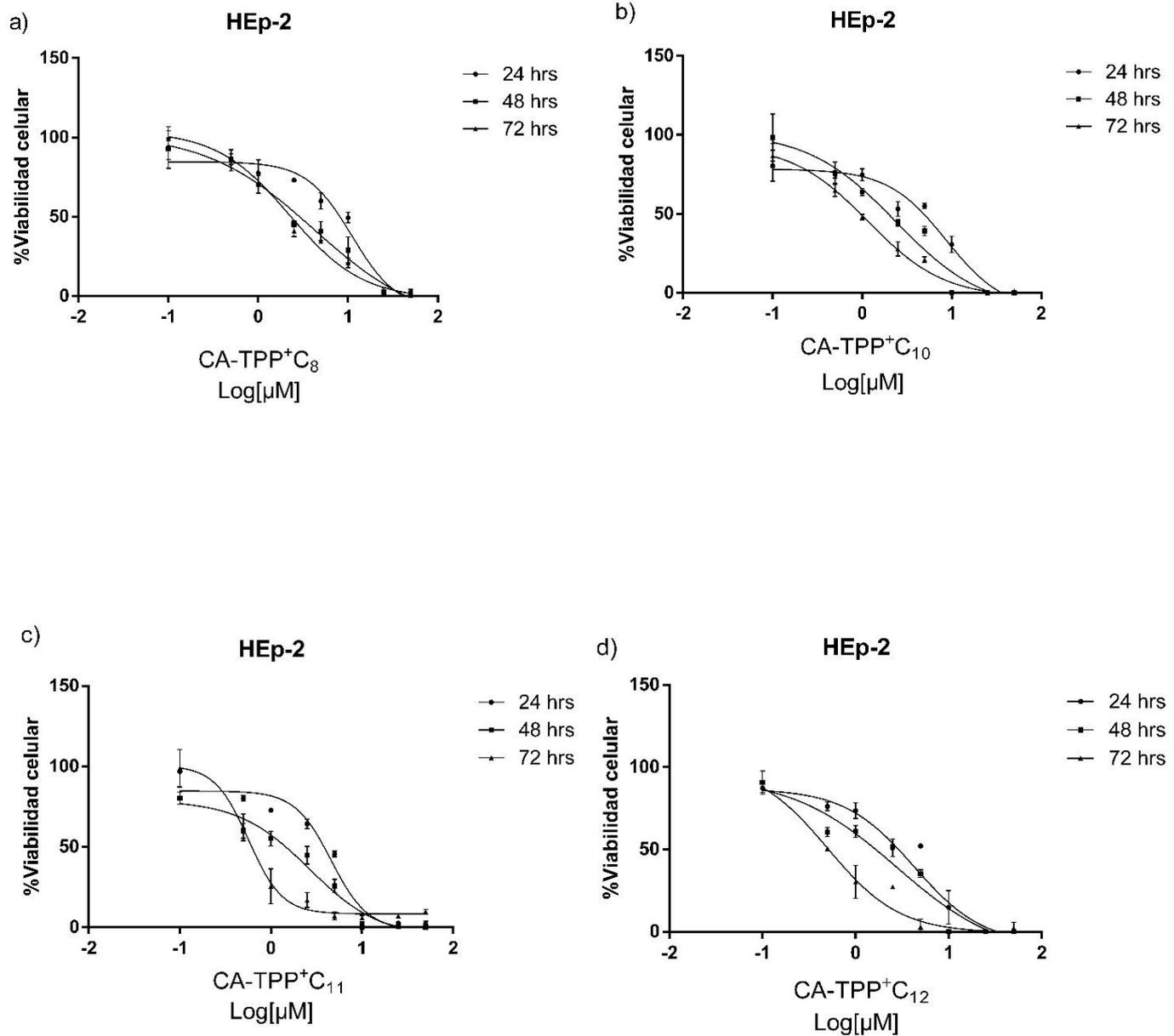


Fig. 3 Curvas de concentración del efecto en la viabilidad celular en línea celular HEp-2 tratadas con concentraciones crecientes de (a) CA-TPP+C₈, (b) CA-TPP+C₁₀, (c) CA-TPP+C₁₁ y (d) CA-TPP+C₁₂ durante 24, 48 y 72 h. Los valores representan los valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Los valores de IC_{50} obtenidos de las curvas de dosis-respuesta, son resumidos en la Tabla 1. Los resultados obtenidos en ambas líneas celulares dan cuenta de una disminución estadísticamente significativa del valor de IC_{50} conforme al aumento del largo de cadena de cada compuesto entre las 24 y 72 h. En relación con ambas líneas celulares, se evidenció diferencias significativas en el valor de IC_{50} para CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ a las 48 y 72 h. con respecto a las 24 h, disminuyendo el valor de IC_{50} al aumento de los tiempos de incubación para un mismo compuesto. Adicionalmente, se evidenció una disminución estadísticamente significativa del valor de IC_{50} al comparar CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ a un mismo tiempo de incubación, obteniendo valores de IC_{50} menores en la línea celular HEP-2 a las 24 y 48 h, mientras que en la línea Cal 27 al cabo de 24 h. El derivado CA-TPP+C₁₀ mostró un IC_{50} menor, por tanto, mostró ser más potente en comparación a los demás compuestos de la serie en línea celular HEP-2. Por otro lado, los derivados CA-TPP+C₁₁ y CA-TPP+C₁₂ mostraron una actividad citotóxica similar a CA-TPP+C₁₀ en la línea celular HEP-2. Además, los compuestos CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ mostraron diferencias significativas en los valores de IC_{50} al compararlos con la línea DOK a las 48 h. Por lo tanto, los resultados sugieren que los compuestos con mayor número de átomos de carbono en la cadena alifática serían más potentes (estadísticamente significativo) en línea celular HEP-2, adicionalmente los compuestos mostraron una actividad dependiente del tiempo de exposición, en ambas líneas celulares.

La comparación de los valores de IC_{50} entre las líneas celulares tumorales y no tumorales se muestran mediante el índice de selectividad, calculado a partir del cociente de los IC_{50} obtenidos para las células no tumorales y células tumorales (Tabla 2). El compuesto CA-TPP⁺C₁₀ demostró ser el derivado más selectivo de la serie para carcinoma espinocelular de células escamosas, con una selectividad aproximada de 10 veces. Por lo tanto, el CA-TPP⁺C₁₀ es el derivado más citotóxico para las células tumorales que las células no tumorales. Por otro lado, no se evidenció una selectividad significativa en los compuestos sobre la línea celular HEp-2, respecto a la línea celular DOK.

Dado que los cationes CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ presentaron efectos citotóxicos contrastantes, ya que CA-TPP⁺C₁₀ no mostró diferencias significativas en la actividad citotóxica comparada con compuestos de cadenas de carbono más larga, no obstante, mostró ser el compuesto más selectivo de la serie; es que decidimos continuar los siguientes experimentos con ambos compuestos con el fin de resaltar las diferencias provocadas por el largo de cadena.

Tabla 2. Índice de selectividad para los derivados CA-TPP⁺ a las 48h. Calculado a partir de la relación IC_{50} entre las células no tumorales y las células tumorales.

<i>Índice de selectividad para CA-TPP⁺ a 48 h.</i>				
	Compuestos			
	CA-TPP ⁺ C ₈	CA-TPP ⁺ C ₁₀	CA-TPP ⁺ C ₁₁	CA-TPP ⁺ C ₁₂
DOK/Cal27	3,9	10,9	N/D	N/D
DOK/HEp-2	1,48	3,7	1,48	1,41

Nota. N/D: no determinado.

6.2 Evaluación del efecto de los derivados de CA en el potencial de transmembrana mitocondrial.

Los resultados obtenidos del $\Delta\Psi_m$ tras la adición de CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ sobre líneas celulares HEP-2 después de 30 min, son graficados en la Fig. 4. Los resultados mostraron que ambos compuestos generaron una disminución progresiva y estadísticamente significativa del $\Delta\Psi_m$, a partir de la concentración 2,5 μM en CA-TPP+C₈ ($p < 0,01$) y 5 μM en CA-TPP+C₁₀ ($p < 0,01$) en línea celular HEP-2. Además, ambos compuestos mostraron diferencias en la actividad en los primeros rangos de concentración probadas, alcanzando similar eficacia en el rango de concentraciones 10-20 μM ($p < 0,0001$) (Fig. 4). Los resultados evidenciaron que ambos compuestos presentan actividad dosis-dependiente en la disminución del $\Delta\Psi_m$ sobre línea celular HEP-2.

Adicionalmente, en la Fig. 5 se muestran los resultados obtenidos tras la adición de CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ sobre la línea celular Cal 27. Ambos compuestos generaron una caída significativa ($p < 0,0001$) y de forma abrupta del $\Delta\Psi_m$. Los compuestos mostraron una actividad independiente de las concentraciones probadas, siendo incluso menor que el FCCP.

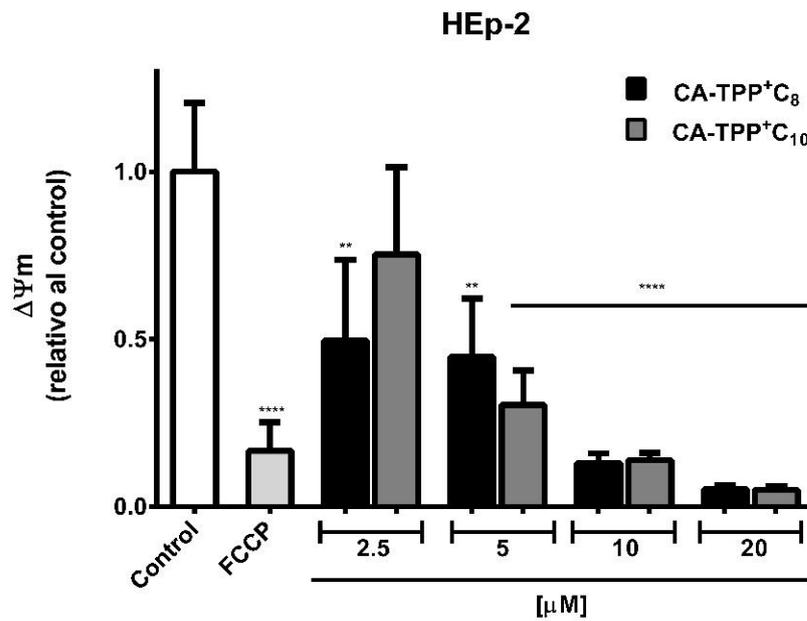


Fig. 4 Evaluación del $\Delta\Psi_m$ en la línea celular HEp-2, tratadas con FCCP (control positivo) y concentraciones crecientes de CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ (2,5-5-10-20 μ M) durante 30 min. La barra color blanco representa el control de DMSO. Los valores representan los valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%. Un asterisco indica $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control (ANOVA). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

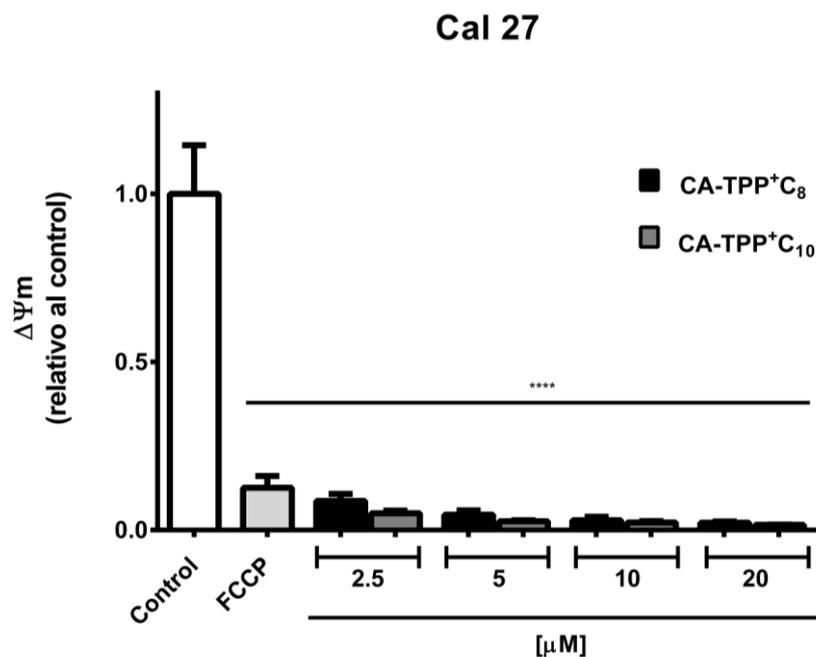


Fig. 5 Evaluación del $\Delta\Psi_m$ en la línea celular Cal 27, tratadas con FCCP (control positivo) y concentraciones crecientes de CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ (2,5-5-10-20 μ M) durante 30 min. La barra color blanco representa el control de DMSO. Los valores representan los valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%. Un asterisco indica $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control (ANOVA). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

6.3 Evaluación del efecto de los derivados de CA en los niveles de ATP intracelular.

Los resultados de la medición de los niveles de ATP luego de 4 h. de la adición de concentraciones 5-10-20-30-50 μM de CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ sobre la línea celular HEp-2, se muestran en las Fig. 6a y 7a, respectivamente. Los resultados revelaron que ambos compuestos disminuyen los niveles de ATP en el rango de concentraciones entre 5-10 μM en forma estadísticamente significativa, alcanzando el 50% de la reducción de los niveles de ATP a la concentración 30 μM en CA-TPP+C₈ ($p < 0,0001$) y 20 μM en CA-TPP+C₁₀ ($p < 0,0001$). CA-TPP+C₁₀ mostró ser más potente en comparación de CA-TPP+C₈ (Fig. 6a y 7a), alcanzando el 50% de disminución en los niveles de ATP a concentración menor (20 μM). Ambos compuestos evidenciaron una actividad concentración dependiente.

Por otro lado, los resultados obtenidos del ensayo de incorporación de PI para visualizar la integridad celular, en la línea celular HEp-2 posterior a la adición de CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ se observan en las Fig. 6b y 7b, respectivamente. Estos mostraron que ambos compuestos en las concentraciones utilizadas generaron una disminución de la viabilidad celular, siendo estadísticamente significativa la concentración de 20 μM ($p < 0,05$) con respecto al control. A la concentración 30 μM ($p < 0,01$) la viabilidad celular disminuye al 50% y al 75% aproximadamente a la concentración 50 μM ($p < 0,0001$). En la línea celular HEp-2, ambos compuestos evidenciaron una correlación entre la caída de los niveles de ATP y el aumento constante de la muerte celular a partir de la concentración 20 μM (Fig. 6 y 7). Sin embargo, los resultados observados en el rango de 5 y 10 μM dan cuenta de una real caída del ATP inducida por CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ sin producir muerte celular.

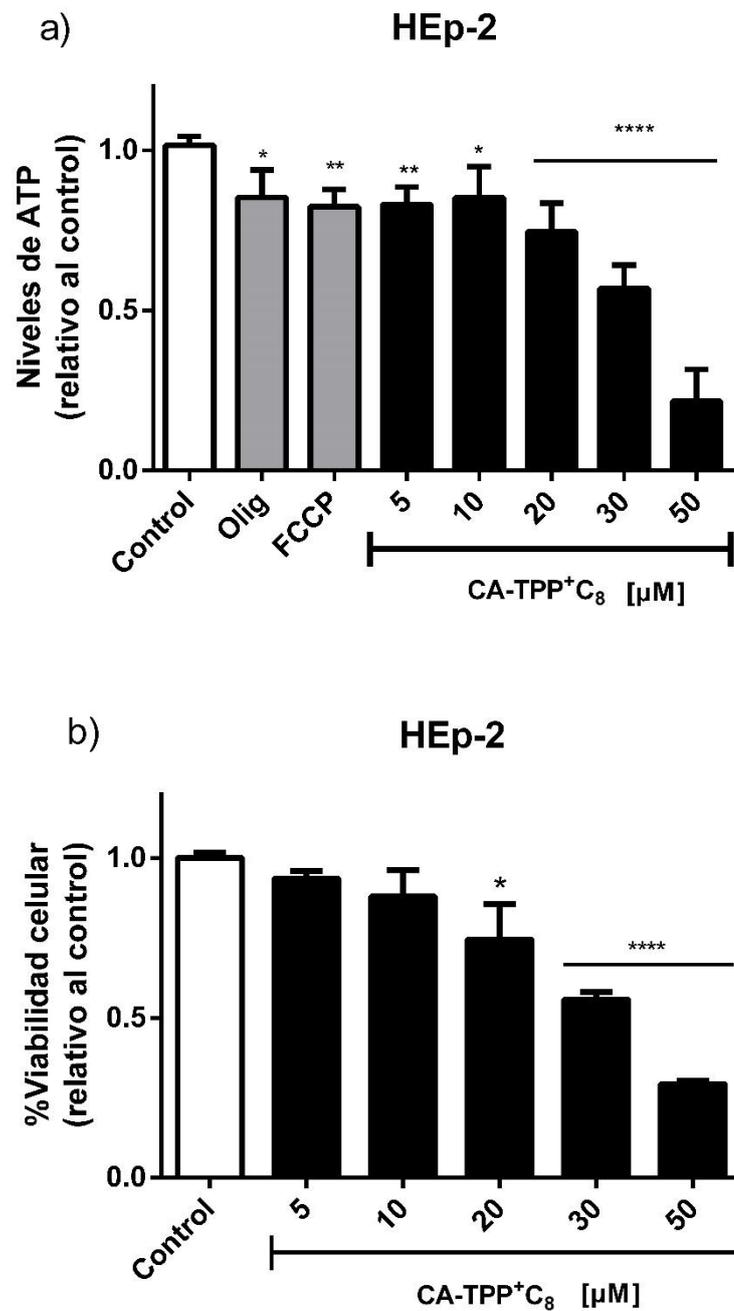


Fig. 6 (a) Evaluación del efecto del compuesto en concentraciones crecientes sobre niveles de ATP intracelular a las 24 h. en línea celular HEP-2. (b) Evaluación del efecto del compuesto en concentraciones crecientes sobre la viabilidad celular. La barra color blanco representa el control de DMSO. La prueba de control de la integridad de la membrana celular se midió a través de la incorporación de PI mediante citometría de flujo. Los valores representan los valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%. Un asterisco indica $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control (ANOVA). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

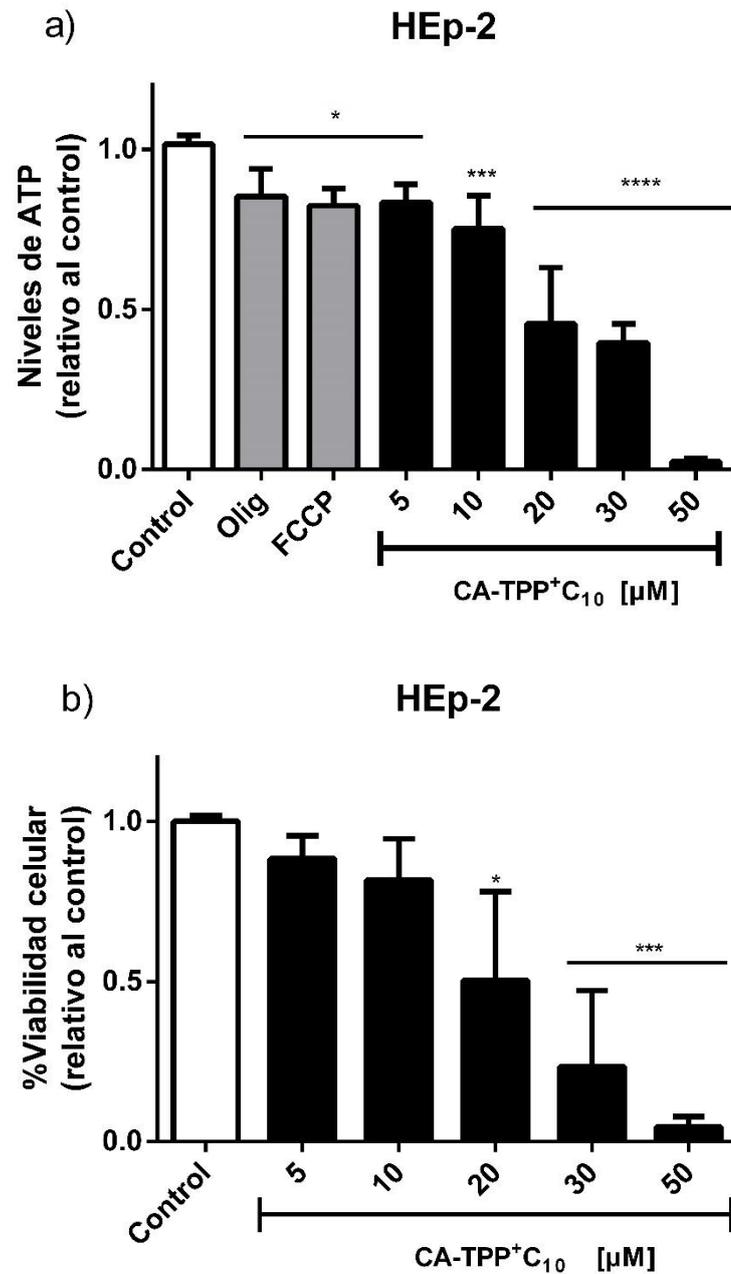


Fig. 7 (a) Evaluación del efecto del compuesto en concentraciones crecientes sobre niveles de ATP intracelular a las 24 h. en línea celular HEp-2. (b) Evaluación del efecto del compuesto en concentraciones crecientes sobre la viabilidad celular. La barra color blanco representa el control de DMSO. La prueba de control de la integridad de la membrana celular se midió a través de la incorporación de PI mediante citometría de flujo. Los valores representan los valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%. Un asterisco indica $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control (ANOVA). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

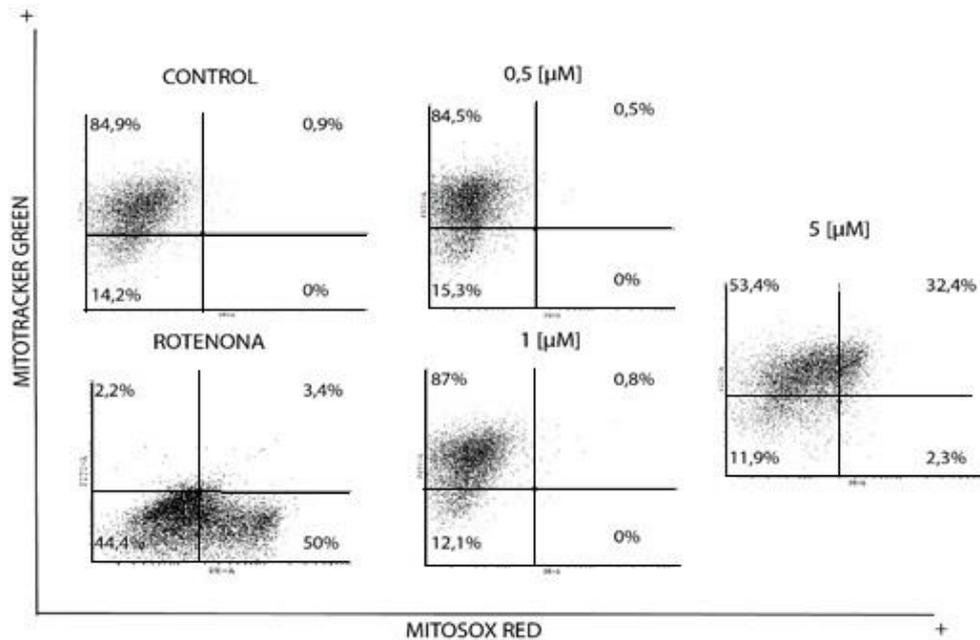
6.4 Evaluación del efecto en la producción de ROS mitocondrial inducida por los derivados del CA en HEp-2.

Los resultados de producción mitocondrial de ROS luego de 24 h. posterior a la adición de concentraciones 0,5-1-5 μM de CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ sobre la línea celular HEp-2 son mostrados en la Fig. 8. Los compuestos revelaron efectos significativos en la producción de ROS mitocondrial al tratar las células con ambos compuestos en fases tempranas (Fig.9), aumentando la producción de ROS paulatinamente (no significativo) en las concentraciones 0,5-1 μM , incrementando significativamente la producción de ROS mitocondrial a la concentración 5 μM ($p < 0,0001$). Adicionalmente, a la concentración 5 μM el compuesto CA-TPP+C₈ mostró una producción de ROS mitocondrial ($p < 0,001$) superior al control positivo (Fig.9a); CA-TPP+C₁₀ reportó una mayor producción de ROS mitocondrial ($p < 0,0001$) comparada a la Rotenona (Fig. 9b). Ambos compuestos evidenciaron una actividad dosis-dependiente. Los resultados evidenciaron una mayor eficacia de CA-TPP+C₁₀ ($p < 0,0001$) en comparación a CA-TPP+C₈ ($p < 0,001$) notoriamente en la concentración 5 μM .

La masa mitocondrial también fue evaluada en este experimento a través de la incorporación de la sonda Mitotracker™ Green posterior a 24 h. después de la adición de ambos compuestos sobre la línea celular HEp-2. Los resultados indicaron que los compuestos no reducirían la masa mitocondrial (Fig.10). La Fig. 8a y 8b grafica el porcentaje de incorporación de las sondas en la línea celular HEp-2 tras la adición de CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ respectivamente después de 24 h. donde el “eje y” representa la incorporación de MitoTracker™ Green y el “eje x” la incorporación de MitoSOX™ Red formando 4 cuadrantes. Los resultados mostraron un desplazamiento de los porcentajes desde el cuadrante superior izquierdo (MitoSOX™ Red - / MitoTracker™ Green +) al cuadrante superior derecho (MitoSOX™ Red +/ MitoTracker™ Green +) conforme el aumento de las concentraciones de compuesto ensayadas, alcanzando un porcentaje máximo a la concentración de 5 μM en ambos compuestos (32,4% CA-TPP+C₈ y 61,2% CA-TPP+C₁₀) esto indica un aumento en la producción de ROS al interior de la mitocondria. Por lo tanto, los resultados

señalan que ambos compuestos indujeron un aumento de la producción de ROS mitocondrial significativa sin alterar la masa mitocondrial a las concentraciones y tiempos ensayados.

a)



b)

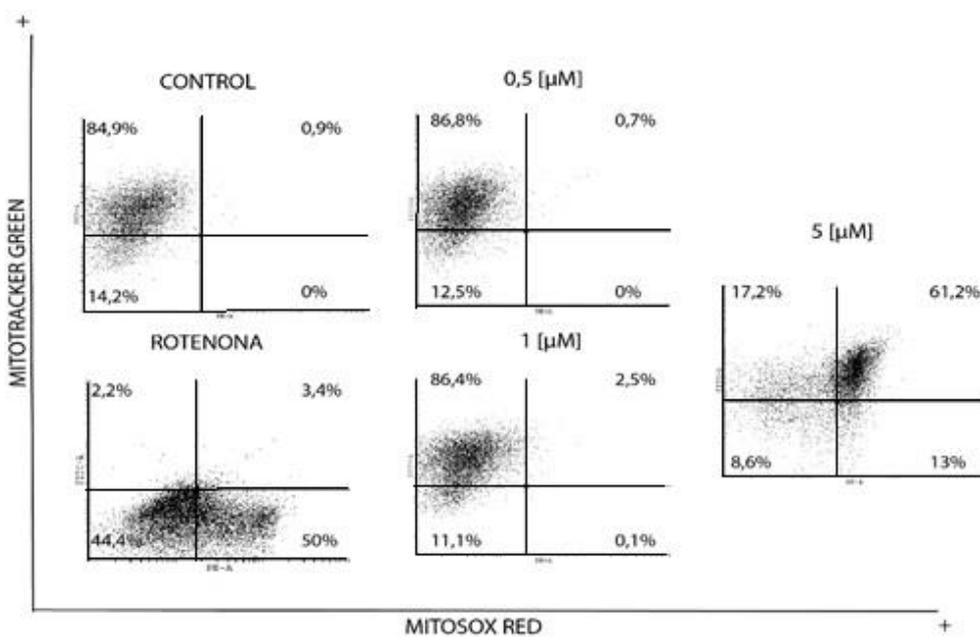


Fig.8 Gráfico de puntos que muestra porcentaje de incorporación de sonda Mitotracker green/Mitosox red en línea celular HEp-2 a las 24 h, después de ser incubadas con concentraciones (0,5-1-5 μM) de (a) CA-TPP+C₈ y (b) CA-TPP+C₁₀.

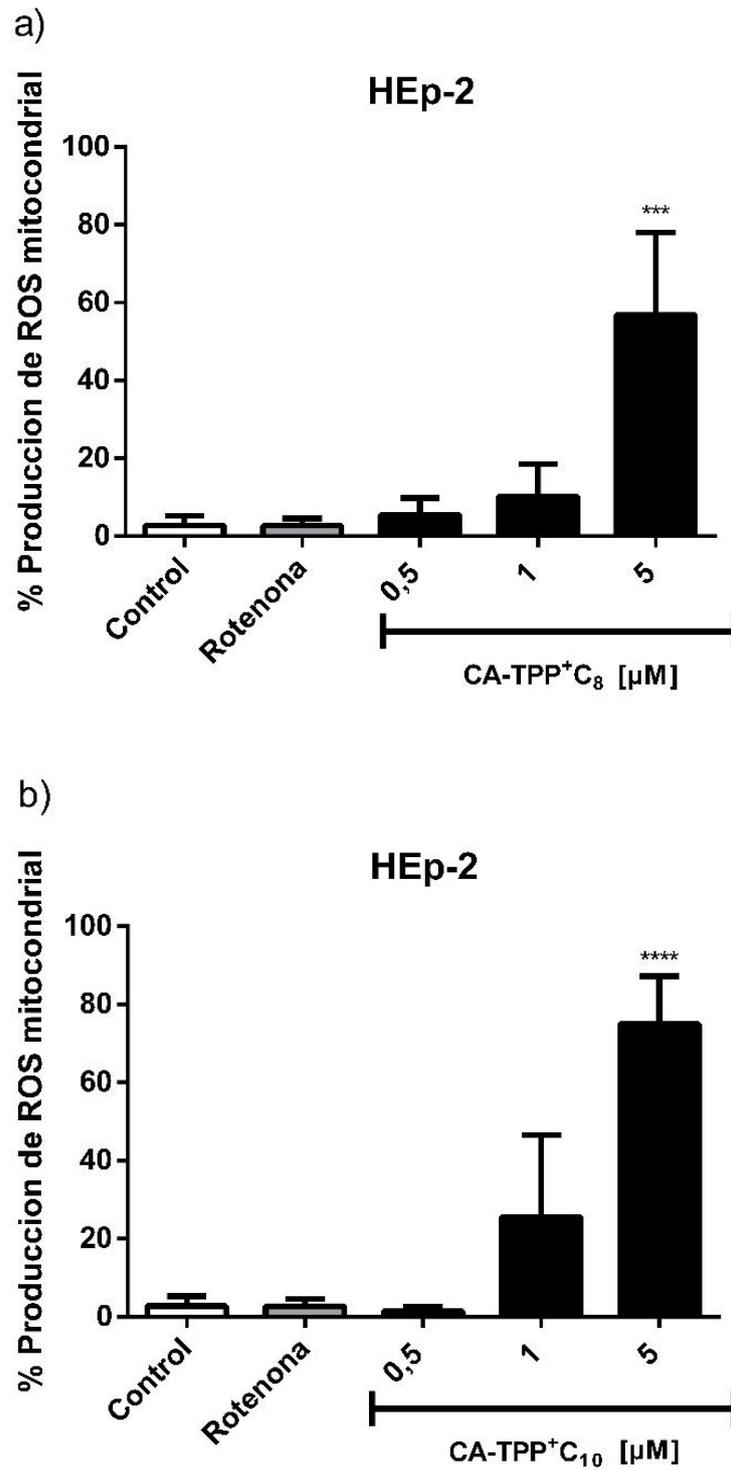


Fig.9 Evaluación del efecto de concentraciones 0,5-1-5 μM de (a) CA-TPP⁺C₈ y (b) CA-TPP⁺C₁₀ en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondrial en línea celular HEp-2 a las 24 h. La barra color blanco representa el control de DMSO. Los valores representan los valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%. Un asterisco indica $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control (ANOVA). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$.

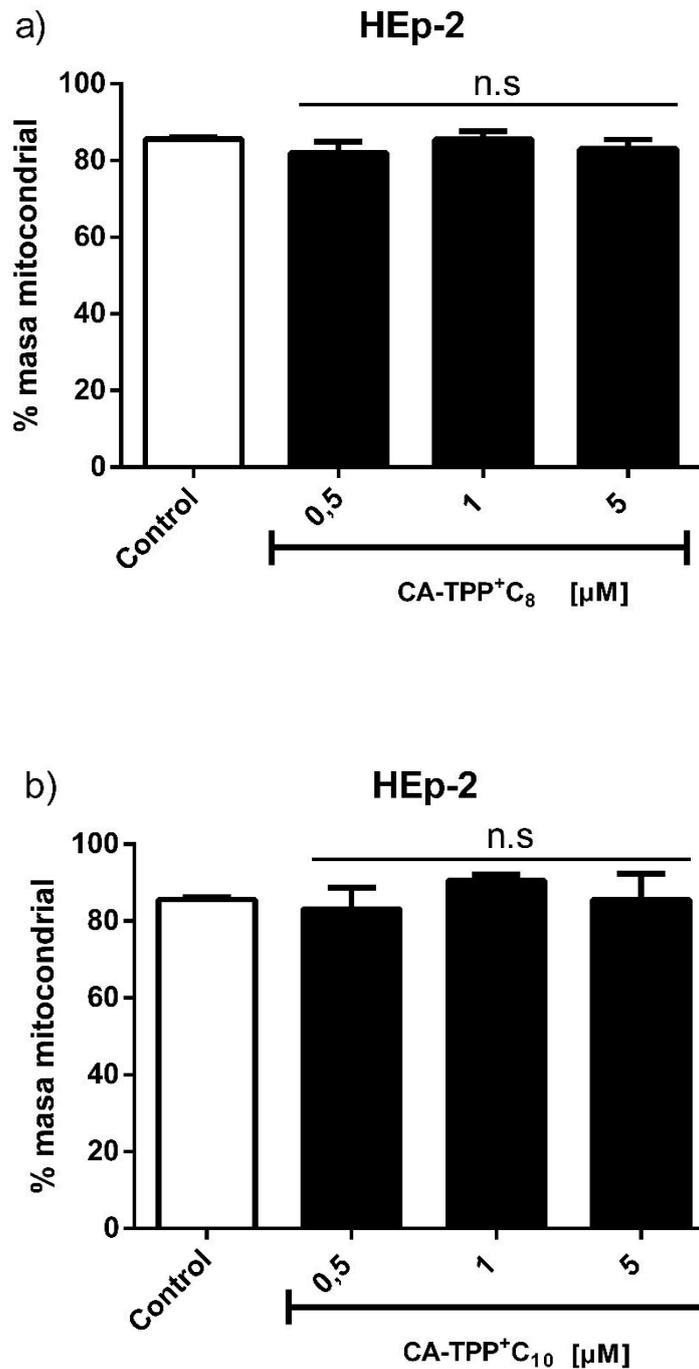


Fig.10 Evaluación del efecto de concentraciones 0,5-1-5 µM de (a) CA-TPP⁺C₈ y (b) CA-TPP⁺C₁₀ sobre la masa mitocondrial en línea celular HEp-2 a las 24 h. La barra color blanco representa el control de DMSO. Los valores representan los valores promedio de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las barras de error corresponden al intervalo de confianza del 95%. Un asterisco indica p<0,05 en comparación con el grupo de control (ANOVA). ** p< 0,01 ***p<0,001 ****p<0,0001.

6.5 Resultados esperados.

Los resultados de la medición de los niveles de ATP esperados luego de 24 h. de la adición de las concentraciones ensayadas de CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ sobre la línea celular Cal 27 producirían una disminución significativa de los niveles de ATP con respecto al control, similar a lo visto en línea celular HEP-2. CA-TPP+C₁₀ debería ser más potente en comparación a CA-TPP+C₈. Ambos compuestos inducirían una actividad dosis-dependiente, disminución significativa y progresiva de los niveles de ATP.

Los resultados esperados de producción mitocondrial de ROS, luego de 24 h. posterior a la adición de concentraciones ensayadas de CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ sobre la línea celular Cal 27 inducirían efectos significativos en la producción de ROS mitocondrial en fases tempranas. Los compuestos podrían mostrar un incremento significativo a la concentración 5 µM mayor a lo visto en la línea celular HEP-2. Ambos compuestos inducirían una actividad dosis-dependiente. Los resultados evidenciarían una mayor eficacia de CA-TPP+C₁₀ en comparación a CA-TPP+C₈ notoriamente a la concentración 5 µM. Por otro lado, la incorporación de Mitotracker™ Green evaluada a las 24 h. después de la adición de los compuestos en línea celular Cal 27 mostrarían que ambos compuestos no alterarían la masa mitocondrial similar a lo visto en línea celular HEP-2. Por lo tanto, los resultados sugerirán que la adición de ambos compuestos aumentaría la producción de ROS mitocondrial significativa sin alterar la masa mitocondrial.

7. DISCUSIÓN

Son diversos los reportes recientes que han provisto de evidencia de la actividad citotóxica de los derivados del CA, compuesto polifenólico encontrado en gran cantidad de alimentos comunes en nuestra dieta. Los derivados del CA han sido descritos como agentes con efectos antioxidantes, así también como una alta gama de actividades biológicas, incluyendo propiedades antitumorales y antiinflamatorias (Göçer y cols, 2011; Grossoy cols, 2017). De esta manera, el CA y sus derivados inducen efecto citotóxico en múltiples líneas celulares tumorales, incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón e incluso cáncer oral (Chen y cols., 2014; Chung y cols., 2017; Kabała-Dzik y cols., 2018; Marin y cols., 2019). A pesar de esto, las altas concentraciones documentadas para alcanzar tal efecto antitumoral en modelos *in vitro*, siguen siendo una dificultad al momento de estudiarlos en modelos *in vivo* (Kuo y cols., 2013; Chen y cols., 2014; Chiang y cols., 2014; Kabala-Dzik y cols., 2017). Estudios previos, han propuesto que la adicción de cationes lipofílicos a las moléculas bioactivas mediante cadenas alquílicas de distinto largo de cadena, inducirían una disminución de las concentraciones necesarias para producir un efecto citotóxico comparado con la molécula original (sin modificar), aumentando su selectividad y generando acumulación de estos en la mitocondria (Jara y cols., 2014; Sandoval-Acuña y cols., 2016; Peredo-Silva y cols., 2017; Jara y cols., 2020).

7.1 Cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico ejercen efecto citotóxico en células tumorales.

Con el fin de mejorar la eficacia y potencia de algunos farmacóforos junto a la conducción de estos hacia la mitocondria, es que son adicionadas moléculas catiónicas a la molécula principal farmacóforos mediante cadenas alifáticas. Este método ha reportado ser una potencial herramienta para incrementar la acumulación de estos compuesto en dichos organelos (Yang y cols., 2016). El

grupo TPP⁺ unido a una cadena alifática ha mostrado tener el potencial de mejorar la citotoxicidad y selectividad de varios compuestos. Además, TPP⁺ ha sido ampliamente usado para concentrar moléculas en la mitocondria, aprovechando la carga deslocalizada entre los grupos aromáticos presentes en su estructura (Trendelewa y cols., 2013). Reportes recientes sobre distintas líneas celulares tumorales tratadas con CA, han señalado valores de IC₅₀ >1000 μM para ejercer efectos citotóxicos, mientras que el tratamiento con el compuesto fenetil éster del ácido cafeico (CAPE), compuesto con mayor afinidad, mostró una disminución significativa de los valores de IC₅₀ al compararlo con CA (IC₅₀ >15 μM) (Wu y cols., 2011; Stojko y cols., 2015; Kabała-Dzik y cols., 2017). Así mismo, los valores de IC₅₀ de CAPE para generar inhibición del crecimiento en líneas de cáncer oral se encuentran en valores >70 μM (Kuo y cols., 2013), incluso se ha reportado valores >100 μM (Lee y cols., 2005). Nuestros resultados dan cuenta de los efectos citotóxicos producidos por los cationes derivados del ácido cafeico, reportando efectos significativos sobre la viabilidad celular de forma dosis dependiente en las condiciones ensayadas y presentando una potencia mayor a los valores descritos para CA y CAPE en estudios previos.

El diseño de estas moléculas con diferentes largos de cadena subyace bajo la necesidad de un adecuado largo de cadena para permitir una mejor intercalación del compuesto en la IMM. El efecto del largo de las cadenas carbonadas unido al farmacóforo, contribuye a la lipofilicidad e incrementa la potencia y selectividad de estos compuestos, como se muestra en la Tabla 1, por lo que es posible establecer una clara relación estructura-actividad. Esto concuerda con estudios previos donde se correlaciona el largo de la cadena alquílica de los ésteres con su efecto en la actividad citotóxica, señalando efectos citotóxicos menos potentes en aquellos de menos de 8 carbonos, mientras que en aquellos de cadenas de carbonos cercanos a un total de 15 carbonos evidenciaron efectos mayormente tóxicos y no específicos (Takai y cols., 2011; Jara y cols., 2014). En efecto, las diferencias en la eficacia, potencia y selectividad de los compuestos dependerían de la longitud del extremo alquilo de la cadena. Estos resultados sugerirían que el mecanismo más probable de citotoxicidad estaría relacionado en la medida que los compuestos se intercalan

en la IMM en función al número de carbonos en la cadena alifática. Adicionalmente, esto último explicaría eventualmente las diferencias observadas entre los compuestos de la serie. Si bien el largo de cadena es de suma importancia en el efecto citotóxico de estos compuestos, la disposición espacial también podría eventualmente conferir un cierto grado de afinidad con proteínas de algún sistema de transporte de membrana interna (Jara y cols., 2014).

Los resultados mostraron que el compuesto CA-TPP⁺C₁₀ tiene los efectos más citotóxicos y selectivos de la serie (Tabla 1 y 2). Por otro lado, CA-TPP⁺C₈ mostró los efectos menos citotóxicos, junto con el índice de selectividad más bajo. A pesar de exhibir una citotoxicidad similar a CA-TPP⁺C₁₀, CA-TPP⁺C₁₁ y CA-TPP⁺C₁₂ en línea celular HEP-2, fueron significativamente menos selectivos mostrando índices de selectividad menores que CA-TPP⁺C₁₀ e IC₅₀ similares en células tumorales y no tumorales, coincidente a lo descrito previamente (Takai, 2011; Jara y cols., 2014). Adicionalmente, la baja selectividad reportada en estos últimos podría eventualmente ocasionar efectos tóxicos y no específicos (Jara y cols., 2014). Los resultados encontrados son concordantes a los obtenidos en estudios en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* sobre células de adenocarcinoma mamario incubados en presencia de derivados del GA unidos a TPP⁺ mediante una cadena alquílica (Jara y cols., 2014; Peredo-Silva y cols., 2017). Nuestros datos revelan que TPP⁺ y la cadena alquílica mejorarían la potencia y selectividad de los efectos citotóxicos del CA, contrastando estos datos con los valores de IC₅₀ previamente descritos (Serafim y cols., 2011; Wu y cols., 2011; Stojko y cols., 2015; Kabała-Dzik y cols., 2017). En efecto, la selectividad sobre células tumorales sigue siendo uno de los problemas críticos en la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, son necesarios estudios posteriores para evaluar la citotoxicidad de CA-TPP⁺C₁₁ y CA-TPP⁺C₁₂ en ambas líneas celulares y evaluar la actividad citotóxica de nuestros compuestos en modelos *in vivo*, donde posiblemente muestren diferencias.

7.2 Cationes lipofílicas derivados del ácido cafeico dirigidos a la mitocondria.

En este trabajo, hemos demostrado que la conjugación de derivados del CA con TPP⁺ mediante una cadena alquílica, proveería la capacidad de inducir perturbación del $\Delta\Psi_m$, en conjunto a la disminución de los niveles de ATP intracelular y aumento en la producción de ROS intra-mitocondrial, estableciendo estrés mitocondrial. La perturbación del $\Delta\Psi_m$ (Fig. 4 y 5) observada estaría explicada mediante la carga negativa de la IMM que atraería los cationes hacia la matriz mitocondrial, cuya carga deslocalizada del grupo TPP⁺ junto al potencial lipofílico aportado por la cadena alifática (Ross y cols., 2005; Madak y cols., 2015) permitirían el transporte selectivo del farmacóforos y la eventual acumulación del compuesto al interior de la mitocondria (Trendelewa y cols., 2013; Jara y cols., 2014). Por otro lado, la evidencia ha demostrado que el CA y sus derivados tendrían una actividad citotóxica induciendo la apoptosis e inhibición de la proliferación y migración celular (Jaganathan y cols., 2012; Lin y cols., 2015; Dziejic y cols., 2017; Sun y cols., 2017). Sin embargo, sus mecanismos aún no están totalmente dilucidados. Estudios previos indican que la actividad de los derivados del CA, como el CAPE estaría relacionada a la inhibición de la activación NF- $\kappa\beta$, involucradas en la muerte y supervivencia celulares, previniendo la translocación de p65 y bloqueando unión NF- $\kappa\beta$ y el ADN (Natarajan y cols., 1996; Kuo y cols., 2015). Además, líneas celulares tumorales tratadas con CAPE, mostraron una inhibición de la vía IP3/Akt y mTOR en línea celulares de cáncer colorrectal, las cuales son vías involucradas en la tumorigénesis (Chiang y cols., 2014). Se ha visto que en líneas celulares tumorales posteriormente a ser tratadas con CAPE, una modulación de vía de señalización MAPK involucradas en proliferación, diferenciación y apoptosis (Lee y cols., 2003; Lin y cols., 2015; Chung y cols., 2017). Adicionalmente, CAPE induciría al arresto del ciclo celular G1 o G2/M en diferentes líneas celulares tumorales (Masaaki y cols., 2001; Watabe y cols., 2004; Chuu y cols., 2012; Chiang y cols., 2014). Así mismo, el CA ha demostrado de inducir el arresto del ciclo celular en fase G1/S en líneas celulares de cáncer de pulmón (Min y cols., 2018), carcinoma espino celular de cabeza y cuello (Dziejic y cols., 2017), cáncer de mama (Serafim y cols., 2011; Kabała-Dzik y cols., 2017) y líneas

celulares de melanoma humano (Pelinson y cols., 2019). En base a la evidencia podemos sugerir que las modificaciones hechas en estos compuestos proveerían un nuevo modo de acción distinto a los mecanismos descritos previamente para los derivados del CA.

Los resultados mostraron que sobre la línea celular HEp-2, CA-TPP+C₈ y CA-TPP+C₁₀ exhibieron una leve diferencia en la disminución del $\Delta\Psi_m$ a concentraciones iniciales (2,5-5 μM) (Fig. 4), estabilizando ambos su caída a las mayores concentraciones probadas. Así mismo, las diferencias observadas entre compuestos podrían deberse al largo de cadena alifática, como se mencionó previamente. Nuestros resultados son consistentes con el estudio previo de Jara y cols. (2014), donde evaluaron la actividad de cationes lipofílicos derivados del GA en la línea celular TA3/Ha de adenocarcinoma mamario, reportando una disminución del $\Delta\Psi_m$. Así mismo, los resultados son similares a los obtenidos en las líneas celulares de cáncer colorrectal HCT-15 y COLO 205 al incubarlas con cationes lipofílicos derivados del GA (Jara y cols., 2020) y en líneas de cáncer de mama donde mostraron una sustancial caída de $\Delta\Psi_m$ posterior a la incubación con cationes lipofílicos derivados del GA (Fuentes y cols., 2020). Por otro lado, estudios previos de derivados de CA y derivados con otras modificaciones han reportado resultados sobre el $\Delta\Psi_m$ (Avci y cols., 2011; Jaganathan y cols., 2012; Tomizawa y cols., 2013; Jia y cols., 2014; Yang y cols., 2014; Zhang y cols., 2017). Avci et al y cols., reportó una disminución significativa en el $\Delta\Psi_m$ e inducción de la apoptosis mediante la estimulación con CAPE en línea celular CCRF-CEM de células de leucemia linfoblástica aguda de células T humanas. Adicionalmente, estudios en la línea celular A549 de cáncer de pulmón posteriormente a ser estimulada con ácido cafeico n-butyl éster, provocaron una disminución del $\Delta\Psi_m$ junto a la caída de los niveles de ATP intracelular (Zhang y cols., 2017). Así mismo, el ácido cafeico undecil éster redujo significativamente el $\Delta\Psi_m$ sobre línea celular NALM-6 de células B de leucemia humana (Tomizawa y cols., 2013). Podemos sugerir en base estos antecedentes, que las modificaciones realizadas a CA otorgarían la capacidad de tropismo por la mitocondria, provocando perturbación en el potencial electroquímico de la IMM.

Interesantemente, hemos reportado que ambos compuestos provocaron una caída radical del $\Delta\Psi_m$ sobre la línea celular Cal 27, independiente del largo de cadena e incluso de las concentraciones ensayadas (Fig.5). Esto sugeriría una mayor diferencia de potencial exhibida en las mitocondrias de la línea celular de carcinoma espinoso celular escamoso y/o inclusive, que esta línea celular posea menor cantidad de mitocondrias en condiciones basales. Estudios previos *in vitro* e *in vivo* sobre la línea Cal 27, tratadas con compuestos a partir de extractos naturales, reportaron una disminución significativa del $\Delta\Psi_m$ en las condiciones ensayadas (Fan y cols., 2011; Huang y cols., 2014). Tang y cols. (2019), reportó que en la línea celular Cal 27 posteriormente a ser tratadas con ENAV (en inglés, *ethyl acetate extract of Nepenthes ventricosa x máxima*) hubo una disminución del $\Delta\Psi_m$, mostrando que, en condiciones de control, esta línea celular ya presentaba una mayor diferencia $\Delta\Psi_m$. A pesar de esto, es necesaria mayor evidencia para sustentar esta idea, de este modo sugerimos experimentos posteriores para indagar en este hallazgo.

Nuestros resultados señalan que ambos compuestos alteraron de forma significativa la actividad electroquímica de la membrana mitocondrial interna en ambas líneas celulares, como consecuencia de mecanismos aun no dilucidados. Se ha descrito que la despolarización de la IMM y eventualmente un aumento de la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP en inglés, *mitochondrial membrana permeabilization*) tendrían un efecto pivote para la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis (Prasad y cols., 2011; Wilkins y cols., 2017). Este evento, permitiría el clivaje y activación de caspasas, las cuales son requeridas para la manifestación rápida y completa de la apoptosis (Green y cols., 2015). De esta forma, la liberación de citocromo c, que normalmente reside en la IMM donde funciona como lanzadera de electrones en la cadena respiratoria, interactuaría con proteínas de apoptosis proteasa activada factor-1 (Apaf-1 en inglés, *apoptosis protease activating factor-1*), proteína preexistente en el citosol como un monómero y dependiendo su activación mediante el citocromo c. Esta interacción resultaría en la formación del apoptosoma, guiando la activación de caspasas y la muerte celular (Green y cols., 2015; Kalpage y cols., 2020). Se ha descrito que la liberación del citocromo c sería consecuencia de la oxidación de

CL mediada por ROS (Pramanik y cols., 2011; Nakagawa y cols., 2013; Kaminsky y cols., 2014). Por otro lado, la disrupción en el balance en la expresión de proteínas pro y anti apoptóticas de la familia Bax y Bcl-2 en la OMM, generarían una alteración en la integridad y aumento de la permeabilidad de esta misma (Kroemer y cols., 2007; Jia y cols., 2014; Yang y cols., 2014; Green y cols., 2015). Estudios previos demuestran que posterior a la estimulación con CAPE en líneas celulares tumorales se evidencio un aumento en la expresión de proteínas pro apoptóticas junto a cambios conformacionales, translocación mitocondrial y oligomerización, sugiriendo de esta forma la inducción de la vía intrínseca de la apoptosis (Ho y cols., 2011; Yu y cols., 2017). Estudios sobre línea celular A549 de cáncer de pulmón, estimuladas con CAPE reportaron cambios en los niveles de expresión de proteínas pro-anti apoptóticas, que ejercerían la activación de caspasa 12, -9 y -3 induciendo la vía intrínseca de la apoptosis (Chen y cols., 2014). En base a la evidencia disponible, podemos sugerir que estos compuestos serian transportados y acumulados dentro de la mitocondria (Fulda y cols., 2010; Boukalova y cols., 2018), provocando eventualmente la alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna mediante la despolarización de esta misma, esto eventualmente induciría a la activación de vías intrínsecas de apoptosis de muerte celular. De este modo, no se descartaría la idea de que nuestros compuestos eventualmente afectarían la permeabilidad de la OMM, induciendo la muerte celular. Sin embargo, aún son necesarios estudios posteriores para tener conocimiento de los mecanismos involucrados en el efecto citotóxico y mecanismos de muerte celular ejercidos por nuestros compuestos.

7.3 Cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico inducen estrés mitocondrial.

OXPHOS es el proceso por el cual se lleva a cabo la síntesis de ATP mediante una serie de pasos de transferencia de electrones a través de complejos proteicos en la membrana mitocondrial interna. En este proceso, el oxígeno es consumido y un gradiente electroquímico es establecido conduciendo la síntesis de ATP (Van Der Bliet y cols., 2017). Recientes estudios han

mostrado que un correcto ensamble de los componentes de OXPHOS es necesario para la formación de tumores y metástasis (Lebleu y cols., 2014; Bajzikova y cols., 2019). Por ende, se sugiere que la perturbación en este proceso llevaría a una disfunción mitocondrial causando déficit de ATP e inducción de estrés oxidativo, estableciendo estrés mitocondrial y activación de procesos apoptóticos (Kroemer y cols., 2007). En efecto, la inhibición (Zhao y cols., 2019; Fuentes y cols., 2020) o desacoplamiento (Sandoval-Acuña y cols., 2016; Jara y cols., 2020) de la respiración celular, serían mecanismos eficientes para inducir disfunción y estrés mitocondrial, guiando la célula a procesos de muerte celular.

Como consecuencia de esta perturbación mitocondrial producida por nuestros compuestos, los niveles de ATP decaen de forma efectiva tras la exposición de las células a CA-TPP⁺C₈ y CA-TPP⁺C₁₀ de manera dosis dependiente en la línea celular HEP-2. Nuestros resultados señalan que ambos compuestos disminuyeron los niveles de ATP intracelular en el rango de concentraciones de 5-10 μ M en fases tempranas sin producir muerte celular (Fig. 6a y 7a). Evidencia previa ha reportado una disminución en los niveles de ATP en líneas celulares tumorales, provocada por la estimulación de CA y derivados de éste (Tyszka-Czochara y cols., 2017; Zhang y cols., 2017). La disminución de los niveles de ATP intracelular se podría explicar como consecuencia de la disipación del $\Delta\Psi_m$, lo cual generaría la disminución en la fosforilación de la glucosa, catalizada mediante HK-II, provocando eventualmente una reducción en el metabolismo glicolítico que es esencial para la progresión del cáncer. La HK-II, como ya lo mencionamos previamente, es una isoenzima sobre expresada en diferentes tipos celulares tumorales y es crucial en la ruta glicolítica (Rodríguez-Enríquez y cols., 2012). El déficit energético en la síntesis de ATP provocaría eventualmente un aumento en la cantidad de AMP al interior de la mitocondria, activando mecanismos compensatorios de generación de ATP (Yuan y cols., 2013). Recientes estudios han asociado el aumento en la relación AMP/ATP con la activación de AMP-proteína quinasa activada (AMPK) (Shaw y cols., 2004). La activación del sensor AMPK actuaría sobre el ciclo celular y la biosíntesis influyendo en la supervivencia celular (Marín-Aguilar y cols., 2017).

AMPK induciría la activación de varias vías de generación de ATP, tales como glucólisis, β -oxidación y la captación de glucosa (Hardie y cols., 2012). Así mismo, dependiendo del contexto celular, la activación o silenciamiento de AMPK regularía las vías metabólicas que a su vez afecta la proliferación celular neoplásica (Steinberg y cols., 2009), pudiendo eventualmente inducir selectivamente la muerte celular (Tyszka-Czochara y cols., 2018). Estudios recientes han reportado la activación de AMPK en líneas celulares tumorales estimuladas con derivados del CA e incluso en conjunto con otros compuestos, regulando vías de señalización como mTOR y el ciclo del ácido cítrico (Chiang y cols., 2014; Tyszka-Czochara y cols., 2017; Tyszka-Czochara y cols., 2018). Podemos sugerir que la actividad de nuestros compuestos sobre los niveles de ATP eventualmente induciría a la activación de AMPK independiente del mecanismo de acción, pudiendo desempeñar un rol en un intento celular de compensar una disminución inicial en los niveles de ATP. No obstante, son necesarios experimentos posteriores para sustentar esta idea.

Desde el punto de vista mecánico, nuestros resultados coinciden con estudios previos con cationes lipofílicos derivados del GA en la disminución de los niveles de ATP intracelular en diferentes líneas celulares tumorales, indicando que el mecanismo de acción es a través desacoplamiento de OXPHOS (Sandoval-Acuña y cols., 2016; Jara y cols., 2020). Así mismo, Fuentes y cols. (2020), ampliaron el estudio de los cationes lipofílicos derivados del GA en líneas celulares de cáncer de mama, señalando que estos compuestos tendrían un efecto desacoplante de OXPHOS en una fase inicial, mientras que con el aumento del tiempo de exposición estos compuestos reportaron la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria, sugiriendo que esta interacción sería favorecida por TPP⁺. Con relación a derivados de CA, Bonuccelli y cols. (2017), reportó una reducción en el consumo de oxígeno en línea celular MCF-7 posterior al ser tratadas con CAPE, señalando que éste sería un inhibidor de OXPHOS. Podemos sugerir que nuestros compuestos inducirían déficit de ATP intracelular eventualmente a través de la alteración de la cadena respiratoria, generando una alteración en el metabolismo bioenergético tumoral. Sin embargo, los mecanismos involucrados aún no están dilucidados. Por otro lado,

estudios previos con CA señalan que éste reducirían la expresión de transportador de glucosa GLUT1 (Tyszka-Czochara y cols., 2017) así como otros estudios que indicarían lo contrario (Natarelli y cols., 2015).

Junto con la disminución de los niveles de ATP intracelular inducidos por los cationes lipofílicos derivados del CA, observamos un aumento en la producción de ROS al interior de la mitocondria en la línea celular HEp-2 de manera dosis dependiente (Fig. 8). Nuestros resultados mostraron que ambos compuestos exhibieron un incremento progresivo de ROS mitocondrial, alcanzando niveles significativos (5 μ M). Adicionalmente, nuevamente el compuesto CA-TPP+C₁₀ mostró diferencias en la potencia con respecto al compuesto CA-TPP+C₈ (Fig. 8a y 8b). Estos resultados son contrastantes con lo reportado por Sandoval-Acuña y cols. (2016), cuyos resultados señalan que no hubo aumento de las especies reactivas de oxígeno sobre líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 posterior a ser tratadas con cationes lipofílicos derivados del GA. Así mismo, son contrastante con estudios posteriores con cationes lipofílicos derivados del GA en líneas celulares de cáncer colorrectal (Jara y cols., 2020) y cáncer de mama (Fuentes y cols., 2020). Se ha descrito que el estrés oxidativo, es una condición asociada a la disfunción mitocondrial, provocando disfunción de proteínas, oxidación de lípidos, fragmentación del ADN, induciendo de esta manera la activación de vías apoptóticas guiando a la célula a su muerte (Firat y cols., 2019). El estrés oxidativo sería resultado de un desbalance entre ROS intracelular y del sistema de defensa antioxidante (Patlevič y cols., 2016). Se sabe que el aumento en la producción de ROS y su eventual acumulación desencadenaría la apoptosis en células tumorales producto del tratamiento con quimioterapéuticos (Ozben y cols., 2007; Kirshner y cols., 2008). Recientes evidencias sugieren que el CA es un potente antioxidante, con la capacidad de prevenir la producción de ROS, reduciendo el estrés oxidativo (Benković y cols., 2008; Silva y cols., 2014; Mattos y cols., 2015; Sidoryk y cols., 2018). CA actuaría como antioxidante primario y secundario (anti-prooxidantes) (Espíndola y cols., 2019). Como antioxidante primario, éste actuaría mediante la interrupción de la formación de radicales libres inhibiendo la reacción en cadena con otras moléculas (Angelo y cols., 2007; Damasceno y cols., 2017). Este proceso

ocurriría mediante la donación de electrones o hidrógeno del CA a radicales libres, convirtiéndolos en productos estables termodinámicamente, debido a esto presentarían gran estabilidad debido a electrón deslocalizados en el anillo aromático del CA (Damasceno y cols., 2017). Por otro lado, el CA como un antioxidante secundario, actuaría como grupo quelante. Esté formaría complejos con metales (Fe^{2+} y Cu^{2+}), inhibiendo la descomposición de peróxidos, reduciendo la formación de radicales libres, impidiendo la peroxidación de lípidos y uniéndose a las bases del ADN, evitando de este modo la formación de lesiones y la pérdida de la integridad celular (Angelo y cols., 2007; Damasceno y cols., 2017). En contraste, estudios previos señalan que CA y derivados incrementarían la producción de ROS en líneas celulares tumorales (Jia, 2014; Yang, 2014; Tyszka-Czochara, 2017). Jaganathan y cols. (2012), reportaron una disminución del $\Delta\Psi_m$ y aumento en la producción de ROS en línea celular HCT-15 posterior a ser estimuladas con CA, concluyendo que CA induciría estrés oxidativo e inducción de vías apoptóticas. Así mismo, Zhang y cols. (2017), reportaron que en la línea celular A549 posteriormente a ser estimulada con ácido cafeico n-butyl éster, hubo una disminución del $\Delta\Psi_m$, disminución de los niveles de ATP y generación de ROS, concluyendo que el compuesto probado estaría eventualmente relacionado a procesos inespecíficos de muerte celular. Estudios previos han señalado que la inducción de estrés oxidativo mediante CAPE posiblemente estaría asociado a la inhibición del crecimiento tumoral y disminución de ROS intracelular relacionándolo con la inducción de vías apoptóticas (Ozturk y cols., 2012). Marín y cols. (2018), reportaron que CAPE y derivados de este inducirían el estrés oxidativo en las líneas celular MM 8226 de mieloma múltiple, mediante una inhibición en los niveles de glutatión (GSH en inglés, *glutathion*) junto a la mantención de la producción de ROS intracelular. Así mismo, estudios previos señalan que derivados de CA provocarían una disminución en la defensa antioxidante intracelular en línea celular tumoral (Yang y cols., 2014). Si bien la evidencia disponible con respecto al rol de los derivados del CA en la inducción de estrés oxidativo no es totalmente clara, podemos sugerir que nuestros compuestos inducirían estrés oxidativo mediante el aumento en la producción de ROS mitocondrial y su eventual acumulación, generando estrés mitocondrial e inducción de la apoptosis (Kaminsky y cols., 2014). Esto supondría un mecanismo diferente posiblemente relacionado a las

modificaciones y eventualmente al blanco farmacológico. No obstante, son necesarios estudios posteriores para sustentar la anterior idea.

Los resultados obtenidos a partir del ensayo sobre la masa mitocondrial señalan que ambos compuestos no provocaron efectos sobre ésta en los rangos de concentración probadas sobre línea celular HEP-2 (Fig. 9a y 9b). Se ha descrito que la masa mitocondrial estaría dictada por dos vías opuestas entre sí, la biogénesis y el recambio, que han surgido como factores y reguladores involucrados en la tumorigénesis (Vyas y cols., 2016; Van Der Bliet y cols., 2017). El rol de la biogénesis tumoral en el cáncer está regulado mediante factores tales como estado metabólico, heterogeneidad tumoral, tipo de tejido, microambiente y estadio tumoral (Vyas y cols., 2016; Zong y cols., 2016). En este sentido, se ha documentado que células neoplásicas con un alto metabolismo glicolítico exacerban la expresión de OXPHOS y genes relacionados con la biogénesis mitocondrial para suministrar ATP y superóxido para mantener las características metastásicas (Lebleu y cols., 2014; Porporato y cols., 2014; Maiuri y cols., 2015). La biogénesis tumoral estaría regulada por programas transcripcionales que coordinan la inducción de genes localizados tanto en las mitocondrias como en el núcleo que codifican proteínas mitocondriales (Tan y cols., 2016). Se ha descrito que la privación sostenida de energía podría resultar en la regulación positiva de la biogénesis mitocondrial mediada por AMPK a través del coactivador transcripcional peroxisoma receptor activado por proliferador gamma coactivador-1 alfa (PGC1 α) el cual es un regulador central de la biogénesis mitocondrial (Tan y cols., 2016; Vyas y cols., 2016; Van Der Bliet y cols., 2017), permitiendo que la célula tenga mayor plasticidad metabólica (Vyas y cols., 2016; Zong y cols., 2016; Pustynnikov y cols., 2018). Adicionalmente, un efector de la biogénesis tumoral es mTOR, el cual es una vía de señalización pro-supervivencia siendo crucial en el crecimiento celular y homeostasis energética (Scarpulla y cols., 2011; Vyas y cols., 2016). En efecto, como comentamos previamente, CA y derivados de éste activarían el sensor AMPK como compensación al déficit energético (Chiang y cols., 2014; Tyszka-Czochara y cols., 2017; Tyszka-Czochara y cols., 2018). La invariación en la masa mitocondrial observada podría explicarse como un efecto

compensatorio al estrés mitocondrial producido por nuestros compuestos mediante el sensor AMPK a través de la activación de PGC1 α , provocando activación de factores transcripcionales y vías de señalización de pro-supervivencia. No obstante, son necesarios estudios posteriores que den cuenta de la relación de nuestros compuestos con mecanismos compensatorios al estrés mitocondrial.

Los resultados evidenciaron que ambos compuestos provocaron una disminución de los niveles de ATP intracelular (Fig. 6 y 7) y aumento progresivo en la producción de ROS al interior de la mitocondria no alterando significativamente la masa mitocondrial (Fig. 10). Estos eventos señalarían la disfunción y estrés mitocondrial provocado por la actividad antitumoral de nuestros compuestos. Como se ha mencionado previamente, la acumulación de especies reactivas del oxígeno es usualmente derivado de una disrupción en el balance entre la producción de ROS y su aclaramiento (Patlevič y cols., 2016), esta disrupción provocaría la inducción de estrés oxidativo, y eventualmente induciría la activación de vías de señalización de muerte celular. En este sentido, la ETC ha sido descrita como la principal fuente de electrones libres requeridos para la producción de ROS (Paradies y cols., 2001; Vera y cols., 2006; Xiao y cols., 2008; Pramanik y cols., 2011; Kaminsky y cols., 2014); además, su disrupción provocada por la inhibición de algún complejo se han asociado con la activación de promotores involucrados en la producción de ROS, a través de la facilitación del escape de electrones desde ETC (Plamena y cols., 2016; Sarniak y cols., 2016). Este evento ha sido identificado como el mecanismo principal para la acumulación de ROS y el efecto citotóxico dependiente del ROS de algunos compuestos antitumorales (Liu y cols., 2016), tales como el Celastrol (Chen y cols., 2011), Rotenona (Jiang y cols., 2017), GA (Frey y cols., 2007) y JS-K (Zhao y cols., 2019). En efecto, la inhibición de complejos I, III y IV de la ETC (Chen y cols., 2003; Dröse y cols., 2008; Pramanik y cols., 2011) provocarían una reducción en el bombeo de protones y una reducción en la fosforilación de NADH (Mayevsky y cols., 2007), molécula involucrada en el intercambio de electrones e hidrógeno, aportando el potencial electroquímico mediante su fosforilación para el bombeo de protones en el complejo I,

eventualmente provocando un déficit energético (Van Der Bliet y cols., 2017). Lo anterior, alteraría la producción de ROS tales como anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) (Dröse y cols., 2008; Van Der Bliet y cols., 2017). Se ha visto en estudios previos una correlación entre la producción de ROS en fases tempranas con mecanismos apoptóticos de muerte celular en compuestos como el GA, el cual ha sido descrito previamente como un inhibidor del complejo I de ETC (Frey y cols., 2007; Chen y cols., 2009). También, Zhao y cols. (2019), reportaron una significativa inhibición en la actividad del complejo I y IV de la ETC, promoviendo la producción de ROS y aumentando los niveles de ROS acumulado en modelos *in vitro* e *in vivo* de línea celulares de cáncer gástrico posteriormente a ser estimuladas con JS-K. Por otro lado, se ha visto producto de la inhibición de la actividad de la ETC mediante compuestos con actividad antitumoral, una disminución en la actividad de enzimas antioxidante tales como superóxido dismutasa (SOD en inglés, *superoxide dismutase*), catalasa o glutatión peroxidasa (GSH-px, *glutathion peroxidase*) enzimas relacionadas en la inhibición del aclaramiento del ROS (Pramanik y cols., 2011; Jiang y cols., 2017; Zhao y cols., 2019). Este evento, contribuiría también a la acumulación de ROS (Casares y cols., 2012; Patlevič y cols., 2016). Basado en lo anterior, podríamos sugerir que nuestros compuestos tendrían un mecanismo de acción de inhibición de alguno de los complejos de la ETC previamente comentados para ejercer su efecto citotóxico, induciendo de esta manera estrés mitocondrial. Esto eventualmente sería una explicación al aumento en la producción de ROS intramitocondrial y disminución de los niveles de ATP bajo las condiciones estudiadas. Adicionalmente, podemos sugerir que nuestros compuestos eventualmente podrían afectar las defensas antioxidantes intracelular, contribuyendo a la inducción de estrés oxidativo. Sin embargo, son necesarios estudios posteriores que señalen la veracidad de estas ideas para nuestros compuestos. Si bien estos resultados son extrapolables y a la vez promisorios para la línea celular Cal 27, son necesarios estudios posteriores que evidencien la actividad de estos compuestos en la producción de estrés mitocondrial, ya que eventualmente podrían existir diferencias en el comportamiento de estos derivados emanados de las diferencias en las mitocondrias de cada línea celular.

8. CONCLUSIÓN

Todos los resultados obtenidos avalan el potencial efecto antitumoral de los cationes lipofílicos derivados del ácido cafeico como fármacos en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello. El mecanismo por el cual ejercen estos compuestos su acción está relacionado con su estructura química: la carga catiónica que le da especificidad hacia la mitocondria de la célula tumoral, la lipofilicidad dada por la cadena alquílica, y la actividad citotóxica del ácido cafeico. El efecto mitocondriotrópico hacia las células tumorales, les confiere una selectividad por dichas células, aumentando su potencia y eficacia, característica que no aparece en los actuales fármacos antitumorales. Estos compuestos también ejercen su actividad disminuyendo los niveles de ATP ejerciendo efecto sobre el metabolismo glicolítico y aumentando la producción de ROS al interior de la mitocondria induciendo estrés mitocondrial en células tumorales, posiblemente dependiente de la línea celular. Por lo tanto, es necesario ampliar el estudio de estas moléculas para continuar explorando selectividad por otras líneas celulares, otros mecanismos involucrados y posteriormente comportamiento en modelos *in vivo*.

Finalmente, si bien estos compuestos son promisorios como alternativa en el tratamiento de etapas avanzadas del cáncer de cabeza y cuello, es importante seguir fortaleciendo como profesionales de la salud estrategias en la prevención para una detección temprana junto con la promoción ampliando la educación sobre estas patologías.

9. REFERENCIAS

- Alfouzan, A. F. (2019). Head and neck cancer pathology: Old world versus new world disease. In *Nigerian journal of clinical practice* (Vol. 22, Issue 1, pp. 1–8). NLM (Medline). https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_310_18
- Altenberg, B., & Greulich, K. O. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*, *84*(6), 1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.010>
- Angelo, P. M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1–9. <http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/7774/7996>
- Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2016). Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 100, pp. 81–85). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.005>
- Arkadiusz Dzedzic, 1 , * Robert Kubina, 2, Agata Kabala-Dzik, 2, & Marta Tanasiewicz 1. (2017, January 12). *Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptotic Response of Head and Neck Squamous Carcinoma Cells (Detroit 562) by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester Derivative*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5266843/>
- Armstrong, J. S. (2007). Mitochondrial medicine: Pharmacological targeting of mitochondria in disease. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 151, Issue 8, pp. 1154–1165). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707288>
- Avci, Ç. B., Gündüz, C., Baran, Y., Şahin, F., Yilmaz, S., Dogan, Z. O., & Saydam, G. (2011). Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *137*(1), 41–47. <https://doi.org/10.1007/s00432-010-0857-0>
- Bajzikova, M., Kovarova, J., Coelho, A. R., Boukalova, S., Oh, S., Rohlenova, K., Svec, D., Hubackova, S., Endaya, B., Judasova, K., Bezawork-Geleta, A., Kluckova, K., Chatre, L., Zabalova, R., Novakova, A., Vanova, K., Ezrova, Z., Maghzal, G. J., Magalhaes Novais, S., ... Neuzil, J. (2019). Reactivation of Dihydroorotate Dehydrogenase-Driven Pyrimidine Biosynthesis Restores Tumor Growth of Respiration-Deficient Cancer Cells. *Cell Metabolism*, *29*(2), 399-416.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.10.014>
- Benković, V., Orsolić, N., Horvat Knežević, A., Ramić, S., Dikić, D., Bašić, I., & Kopjar, N. (2008). Evaluation of the radioprotective effects of propolis and flavonoids in gamma-irradiated mice: The alkaline comet assay study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *31*(1), 167–172. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.167>

- Bergeron, K. L., Murphy, E. L., Majofodun, O., Muñoz, L. D., Williams, J. C., & Almeida, K. H. (2009). Arylphosphonium salts interact with DNA to modulate cytotoxicity. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 673(2), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.01.002>
- Bonuccelli, G., De Francesco, E. M., de Boer, R., Tanowitz, H. B., & Lisanti, M. P. (2017). NADH autofluorescence, a new metabolic biomarker for cancer stem cells: Identification of Vitamin C and CAPE as natural products targeting “stemness.” *Oncotarget*, 8(13), 20667–20678. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15400>
- Boukalova, S., Rohlenova, K., Rohlena, J., & Neuzil, J. (2018). Mitocans: Mitochondrially targeted anti-cancer drugs. In *Mitochondrial Biology and Experimental Therapeutics* (pp. 613–635). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73344-9_27
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Casares, C., Ramírez-Camacho, R., Trinidad, A., Roldán, A., Jorge, E., & García-Berrolcal, J. (2012). Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: Review of physiopathological mechanisms in animal models. In *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* (Vol. 269, Issue 12, pp. 2455–2459). <https://doi.org/10.1007/s00405-012-2029-0>
- Chang, S. E., Foster, S., Betts, D., & Marnock, W. E. (1992). DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype. *International Journal of Cancer*, 52(6), 896–902. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910520612>
- Chen, G., Zhang, X., Zhao, M., Wang, Y., Cheng, X., Wang, D., Xu, Y., Du, Z., & Yu, X. (2011). Celastrol targets mitochondrial respiratory chain complex I to induce reactive oxygen species-dependent cytotoxicity in tumor cells. *BMC Cancer*, 11(1), 170. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-170>
- Chen, H. M., Wu, Y. C., Chia, Y. C., Chang, F. R., Hsu, H. K., Hsieh, Y. C., Chen, C. C., & Yuan, S. S. (2009). Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 286(2), 161–171. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.040>
- Chen, Q., Vazquez, E. J., Moghaddas, S., Hoppel, C. L., & Lesnefsky, E. J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry*, 278(38), 36027–36031. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304854200>
- Chen, Y. C., Kuo, Y. H., Yang, N. C., Liu, C. W., Chang, W. T., & Hsu, C. L. (2014). Cytotoxic and apoptotic effects of caffeate derivatives on A549 human lung carcinoma cells. *Journal of the Chinese Medical Association*, 77(10), 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2014.05.011>

- Chiang, E.-P. I., Tsai, S.-Y., Kuo, Y.-H., Pai, M.-H., Chiu, H.-L., Rodriguez, R. L., & Tang, F.-Y. (2014). Caffeic Acid Derivatives Inhibit the Growth of Colon Cancer: Involvement of the PI3-K/Akt and AMPK Signaling Pathways. *PLoS ONE*, *9*(6), e99631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099631>
- Chiang, E. P. I., Tsai, S. Y., Kuo, Y. H., Pai, M. H., Chiu, H. L., Rodriguez, R. L., & Tang, F. Y. (2014). Caffeic acid derivatives inhibit the growth of colon cancer: Involvement of the PI3-K/Akt and AMPK signaling pathways. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099631>
- Chung, L.-C., Chiang, K.-C., Feng, T.-H., Chang, K.-S., Chuang, S.-T., Chen, Y.-J., Tsui, K.-H., Lee, J.-C., & Juang, H.-H. (2017). Caffeic acid phenethyl ester upregulates N-myc downstream regulated gene 1 via ERK pathway to inhibit human oral cancer cell growth in vitro and in vivo. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(9), 1600842. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600842>
- Chuu, C. P., Lin, H. P., Ciaccio, M. F., Kokontis, J. M., Hause, R. J., Hiipakka, R. A., Liao, S., & Jones, R. B. (2012). Caffeic acid phenethyl ester suppresses the proliferation of human prostate cancer cells through inhibition of p70S6K and Akt signaling networks. *Cancer Prevention Research*, *5*(5), 788–797. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0004-T>
- Cohen, N., Fedewa, S., & Chen, A. Y. (2018). Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. In *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* (Vol. 30, Issue 4, pp. 381–395). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.06.001>
- Cortes, L. A., Castro, L., Pesce, B., Maya, J. D., Ferreira, J., Castro-Castillo, V., Parra, E., Jara, J. A., & López-Muñoz, R. (2015). Novel Gallate Triphenylphosphonium Derivatives with Potent Antichagasic Activity. *PLOS ONE*, *10*(8), e0136852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136852>
- Coulter, C. V., Kelso, G. F., Lin, T. K., Smith, R. A., & Murphy, M. P. (2000). Mitochondrially targeted antioxidants and thiol reagents. *Free Radical Biology & Medicine*, *28*(10), 1547–1554. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00255-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00255-0)
- Damasceno, S. S., Dantas, B. B., Ribeiro-Filho, J., Antônio M. Araújo, D., & Galberto M. da Costa, J. (2017). Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: Implications in Cancer Therapy. A Review. *Current Pharmaceutical Design*, *23*(20). <https://doi.org/10.2174/1381612822666161208145508>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 740, pp. 364–378). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Davis, S., Weiss, M. J., Wong, J. R., Lampidis, T. J., & Chen, L. B. (1985). Mitochondrial and plasma membrane potentials cause unusual accumulation and retention of rhodamine 123 by human breast adenocarcinoma-derived MCF-7 cells. *Journal of Biological Chemistry*, *260*(25), 13844–13850.

- Dong, Y., Zhao, Q., Ma, X., Ma, G., Liu, C., Chen, Z., Yu, L., Liu, X., Zhang, Y., Shao, S., Xiao, J., Li, J., Zhang, W., Fu, M., Dong, L., Yang, X., Guo, X., Xue, L., Fang, F., ... Zhang, L. (2015). Establishment of a new OSCC cell line derived from OLK and identification of malignant transformation-related proteins by differential proteomics approach. *Scientific Reports*, *5*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep12668>
- Dröse, S., & Brandt, U. (2008). The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 Complex. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(31), 21649–21654. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803236200>
- Ettinger, K. S., Ganry, L., & Fernandes, R. P. (2019). Oral Cavity Cancer. In *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* (Vol. 31, Issue 1, pp. 13–29). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.08.002>
- Fan, M. J. ., Lin, Y. C. ., Shih, H. D. ., Yang, J. S. ., Liu, K. C. ., Yang, S. T. ., Lin, C. Y. ., Wu, R. S. ., Yu, C. S. ., Ko, Y. C. ., & Chung, J. G. (2011). *Crude extracts of Agaricus brasiliensis induce apoptosis in human oral cancer CAL 27 cells through a mitochondria-dependent pathway. in vivo.* *25*(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21576408/>
- Feng, Y., Yang, D. S., Tang, H. B., Ding, Y. S., & Li, X. G. (2019). Efficacy and safety of cisplatin for the management of adult patients with oral cancer: A protocol for systematic review. *Medicine (United States)*, *98*(51). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018210>
- Fırat, F., Özgül, M., Türköz Uluer, E., & Inan, S. (2019). Effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on angiogenesis, apoptosis and oxidative stress in various cancer cell lines. *Biotechnic and Histochemistry*, *94*(7), 491–497. <https://doi.org/10.1080/10520295.2019.1589574>
- Frey, C., Pavani, M., Cordano, G., Muñoz, S., Rivera, E., Medina, J., Morello, A., Diego Maya, J., & Ferreira, J. (2007). Comparative cytotoxicity of alkyl gallates on mouse tumor cell lines and isolated rat hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, *146*(4), 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.007>
- Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Peredo-Silva, L., Guzmán-Rivera, D., Pavani, M., Torrealba, N., Truksa, J., Castro-Castillo, V., Catalán, M., Kemmerling, U., Urrea, F. A., & Ferreira, J. (2020). Complex Mitochondrial Dysfunction Induced by TPP+-Gentisic Acid and Mitochondrial Translation Inhibition by Doxycycline Evokes Synergistic Lethality in Breast Cancer Cells. *Cells*, *9*(2), 407. <https://doi.org/10.3390/cells9020407>
- Fulda, S., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2010). Targeting mitochondria for cancer therapy. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 9, Issue 6, pp. 447–464). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd3137>
- G Ozturk, Z Ginis, S Akyol, G Erden, A Gurel, & O Akyol. (2012, December 16). *The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers - PubMed.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23280020/>

- Genaro-Mattos, T. C., Maurício, Â. Q., Rettori, D., Alonso, A., & Hermes-Lima, M. (2015). Antioxidant Activity of Caffeic Acid against Iron-Induced Free Radical Generation—A Chemical Approach. *PLOS ONE*, *10*(6), e0129963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129963>
- Göçer, H., & Gülçin, I. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): Correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *62*(8), 821–825. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.585963>
- González Díaz, M., Motta Vargas, L. A., Moreno Torres, A., Chala Galindo, A. I., Tupaz Erira, H. A., & García Robayo, D. A. (2015). La infección por virus del papiloma humano afecta el pronóstico del cáncer orofaríngeo escamocelular. Revisión de la literatura / Human Papillomavirus Infection Affects Squamous Oropharyngeal Cancer Prognosis. Literature Review. *Universitas Odontologica*, *33*(71), 67. <https://doi.org/10.11144/javeriana.uo33-71.ivph>
- Gonzalvez, F., & Gottlieb, E. (2007). Cardiolipin: Setting the beat of apoptosis. In *Apoptosis* (Vol. 12, Issue 5, pp. 877–885). <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0718-8>
- Gourley, P. L., Hendricks, J. K., McDonald, A. E., Copeland, R. G., Barrett, K. E., Gourley, C. R., Singh, K. K., & Naviaux, R. K. (2005). Mitochondrial correlation microscopy and nanolaser spectroscopy - New tools for biophotonic detection of cancer in single cells. In *Technology in Cancer Research and Treatment* (Vol. 4, Issue 6, pp. 585–592). Adenine Press. <https://doi.org/10.1177/153303460500400602>
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(12), a006080. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080>
- Grivennikova, V. G., & Vinogradov, A. D. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1757, Issues 5–6, pp. 553–561). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.03.013>
- Grosso, G., Godos, J., Lamuela-Raventos, R., Ray, S., Micek, A., Pajak, A., Sciacca, S., D'Orazio, N., Del Rio, D., & Galvano, F. (2017). A comprehensive meta-analysis on dietary flavonoid and lignan intake and cancer risk: Level of evidence and limitations. *Molecular Nutrition & Food Research*, *61*(4), 1600930. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600930>
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 251–262). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>

- Ho, H. C., Chang, H. C., Ting, C. T., Kuo, C. Y., & Yang, V. C. (2011). Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation and migration, and induces apoptosis in platelet-derived growth factor-BB-stimulated human coronary smooth muscle cells. *Journal of Vascular Research*, *49*(1), 24–32. <https://doi.org/10.1159/000329819>
- HW, H., YA, C., HS, C., JY, T., IS, C., & HW, C. (2014). Antiproliferative effects of methanolic extracts of *Cryptocarya concinna* Hance roots on oral cancer Ca9-22 and CAL 27 cell lines involving apoptosis, ROS induction, and mitochondrial depolarization. *TheScientificWorldJournal*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/180462>
- Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., & Okamoto, K. (2017). Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. In *Cancer Science* (Vol. 108, Issue 3, pp. 283–289). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/cas.13155>
- Jara, José A., Castro-Castillo, V., Saavedra-Olavarría, J., Peredo, L., Pavanni, M., Jaña, F., Letelier, M. E., Parra, E., Becker, M. I., Morello, A., Kemmerling, U., Maya, J. D., & Ferreira, J. (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>
- Jara, José Antonio, Rojas, D., Castro-Castillo, V., Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Parra, E., Pavani, M., Maya, J. D., Ferreira, J., & Catalán, M. (2020). Novel benzoate-lipophilic cations selectively induce cell death in human colorectal cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, *65*, 104814. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104814>
- Jia, J., Yang, M., Chen, Y., Yuan, H., Li, J., Cui, X., & Liu, Z. (2014). Inducing apoptosis effect of caffeic acid 3,4-dihydroxy-phenethyl ester on the breast cancer cells. *Tumor Biology*, *35*(12), 11781–11789. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2304-3>
- Jiang, X. W., Qiao, L., Feng, X. X., Liu, L., Wei, Q. W., Wang, X. W., & Yu, W. H. (2017). Rotenone induces nephrotoxicity in rats: oxidative damage and apoptosis. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *27*(7), 528–536. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1333553>
- Johnson, L. V., Walsh, M. L., & Chen, L. B. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(2 II), 990–994. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.2.990>
- Kabala-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzębska-Stojko, Ż., Stojko, R., Wojtyczka, R. D., & Stojko, J. (2017). Migration rate inhibition of breast cancer cells treated by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester: An in vitro comparison study. *Nutrients*, *9*(10). <https://doi.org/10.3390/nu9101144>

- Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Jastrzębska-Stojko, Z., Stojko, R., Wojtyczka, R. D., & Stojko, J. (2017). Comparison of two components of propolis: Caffeic acid (CA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induce apoptosis and cell cycle arrest of breast cancer cells MDA-MB-231. *Molecules*, 22(9), 1554. <https://doi.org/10.3390/molecules22091554>
- Kabała-Dzik, A., Rzepecka-Stojko, A., Kubina, R., Wojtyczka, R. D., Buszman, E., & Stojko, J. (2018). Caffeic Acid Versus Caffeic Acid Phenethyl Ester in the Treatment of Breast Cancer MCF-7 Cells: Migration Rate Inhibition. *Integrative Cancer Therapies*, 17(4), 1247–1259. <https://doi.org/10.1177/1534735418801521>
- Kalpage, H. A., Wan, J., Morse, P. T., Zurek, M. P., Turner, A. A., Khobeir, A., Yazdi, N., Hakim, L., Liu, J., Vaishnav, A., Sanderson, T. H., Recanati, M. A., Grossman, L. I., Lee, I., Edwards, B. F. P., & Hüttemann, M. (2020). Cytochrome c phosphorylation: Control of mitochondrial electron transport chain flux and apoptosis. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 121). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105704>
- Kalyanaraman, B. (2017). Teaching the basics of cancer metabolism: Developing antitumor strategies by exploiting the differences between normal and cancer cell metabolism. In *Redox Biology* (Vol. 12, pp. 833–842). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.04.018>
- Kaminsky, V. O., & Zhivotovsky, B. (2014). Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 21(1), 86–102. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5746>
- Kauffman, M., Kauffman, M., Traore, K., Zhu, H., Trush, M., Jia, Z., & Li, Y. (2016). MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive Oxygen Species*, 2(5), 361. <https://doi.org/10.20455/ros.2016.865>
- Kinnamon, K. E., Steck, E. A., Hanson, W. L., & Chapman, W. L. (1977). In Search of Anti-Trypanosoma cruzi Drugs: New Leads from a Mouse Model. *Journal of Medicinal Chemistry*, 20(6), 741–744. <https://doi.org/10.1021/jm00216a001>
- Kirshner, J. R., He, S., Balasubramanyam, V., Kepros, J., Yang, C. Y., Zhang, M., Du, Z., Barsoum, J., & Bertin, J. (2008). Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(8), 2319–2327. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0298>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. In *Physiological Reviews* (Vol. 87, Issue 1, pp. 99–163). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kuo, Y. Y., Jim, W. T., Su, L. C., Chung, C. J., Lin, C. Y., Huo, C., Tseng, J. C., Huang, S. H., Lai, C. J., Chen, B. C., Wang, B. J., Chan, T. M., Lin, H. P., Chang, W. S. W., Chang, C. R., & Chuu, C. P. (2015). Caffeic acid phenethyl ester is a potential therapeutic agent for oral cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 5, pp. 10748–10766). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms160510748>

- Kuo, Y. Y., Lin, H. P., Huo, C., Su, L. C., Yang, J., Hsiao, P. H., Chiang, H. C., Chung, C. J., Wang, H. D., Chang, J. Y., Chen, Y. W., & Chuu, C. P. (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>
- Lawrence, M. S., Sougnez, C., Lichtenstein, L., Cibulskis, K., Lander, E., Gabriel, S. B., Getz, G., Ally, A., Balasundaram, M., Birol, I., Bowlby, R., Brooks, D., Butterfield, Y. S. N., Carlsen, R., Cheng, D., Chu, A., Dhalla, N., Guin, R., Holt, R. A., ... Pham, M. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, *517*(7536), 576–582. <https://doi.org/10.1038/nature14129>
- Lebleu, V. S., O'Connell, J. T., Gonzalez Herrera, K. N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M. C., De Carvalho, F. M., Damascena, A., Domingos Chinen, L. T., Rocha, R. M., Asara, J. M., & Kalluri, R. (2014). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nature Cell Biology*, *16*(10), 992–1003. <https://doi.org/10.1038/ncb3039>
- Lee, Y. J., Kuo, H. C., Chu, C. Y., Wang, C. J., Lin, W. C., & Tseng, T. H. (2003). Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. *Biochemical Pharmacology*, *66*(12), 2281–2289. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.07.014>
- Lee, Y. T., Don, M. J., Hung, P. S., Shen, Y. C., Lo, Y. S., Chang, K. W., Chen, C. F., & Ho, L. K. (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>
- Lin, H. P., Lin, C. Y., Huo, C., Hsiao, P. H., Su, L. C., Jiang, S. S., Chan, T. M., Chang, C. H., Chen, L. T., Kung, H. J., Wang, H. D., & Chuu, C. P. (2015). Caffeic acid phenethyl ester induced cell cycle arrest and growth inhibition in androgen-independent prostate cancer cells via regulation of Skp2, p53, p21Cip1 and p27Kip1. *Oncotarget*, *6*(9), 6684–6707. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3246>
- Liping Sun, Kai Wang, Xiang Xu, Miaomiao Ge, Yifan Chen, & Fuliang Hu. (2017). *Potential Protective Effects of Bioactive Constituents from Chinese Propolis against Acute Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in Cardiac H9c2 Cells*. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2017/7074147/>
- Liu, Y., Li, Q., Zhou, L., Xie, N., Nice, E. C., Zhang, H., Huang, C., & Lei, Y. (2016). Cancer drug resistance: Redox resetting renders a way. In *Oncotarget* (Vol. 7, Issue 27, pp. 42740–42761). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8600>

- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 441–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154237>
- Madak, J., & Neamati, N. (2015). Membrane Permeable Lipophilic Cations as Mitochondrial Directing Groups. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(8), 745–766. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150302105622>
- Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2015). Essential role for oxidative phosphorylation in cancer progression. In *Cell Metabolism* (Vol. 21, Issue 1, pp. 11–12). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.12.013>
- Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S. A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeflner, A., Hirsch, F., Geuskens, M., & Kroemer, G. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 184(3), 1155–1160. <https://doi.org/10.1084/jem.184.3.1155>
- Marín-Aguilar, F., Pavillard, L. E., Giampieri, F., Bullón, P., & Cordero, M. D. (2017). Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase: A new target for nutraceutical compounds. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18020288>
- Marin, E. H., Paek, H., Li, M., Ban, Y., Karaga, M. K., Shashidharamurthy, R., & Wang, X. (2019). Caffeic acid phenethyl ester exerts apoptotic and oxidative stress on human multiple myeloma cells. *Investigational New Drugs*, 37(5), 837–848. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0701-y>
- Marur, S., & Forastiere, A. A. (2016). Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 91, Issue 3, pp. 386–396). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.12.017>
- Masaaki, M., Kaji, A., Ma, W., Miyamoto, K., & Dong, Z. (2001). Suppression of cell transformation and induction of apoptosis by caffeic acid phenethyl ester. *Molecular Carcinogenesis*, 31(2), 83–89. <https://doi.org/10.1002/mc.1043>
- Massalha, W., Markovits, M., Pichinuk, E., Feinstein-Rotkopf, Y., Tarshish, M., Mishra, K., Llado, V., Weil, M., Escriba, P. V., & Kakhlon, O. (2019). Minerval (2-hydroxyoleic acid) causes cancer cell selective toxicity by uncoupling oxidative phosphorylation and compromising bioenergetic compensation capacity. *Bioscience Reports*, 39(1), BSR20181661. <https://doi.org/10.1042/BSR20181661>
- Mayevsky, A., & Rogatsky, G. G. (2007). Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: From animal models to human studies. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 292, Issue 2). Am J Physiol Cell Physiol. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00249.2006>
- McGranahan, N., & Swanton, C. (2017). Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. In *Cell* (Vol. 168, Issue 4, pp. 613–628). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>

- Millard, M., Pathania, D., Shabaik, Y., Taheri, L., Deng, J., & Neamati, N. (2010). Preclinical Evaluation of Novel Triphenylphosphonium Salts with Broad-Spectrum Activity. *PLoS ONE*, 5(10), e13131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013131>
- Min, J., Shen, H., Xi, W., Wang, Q., Yin, L., Zhang, Y., Yu, Y., Yang, Q., & Wang, Z. N. (2018). Synergistic anticancer activity of combined use of caffeic acid with paclitaxel enhances apoptosis of non-small-cell lung cancer H1299 cells in vivo and in vitro. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(4), 1433–1442. <https://doi.org/10.1159/000492253>
- Modica-Napolitano, J. S., & Singh, K. K. (2004). Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*, 4(5-6 SPEC. ISS.), 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.027>
- Monteiro Espíndola, K. M., Ferreira, R. G., Mosquera Narvaez, L. E., Rocha Silva Rosario, A. C., Machado Da Silva, A. H., Bispo Silva, A. G., Oliveira Vieira, A. P., & Chagas Monteiro, M. (2019). Chemical and pharmacological aspects of caffeic acid and its activity in hepatocarcinoma. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, Issue JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00541>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Murphy, M. P. (2008). Targeting lipophilic cations to mitochondria. In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1777, Issues 7–8, pp. 1028–1031). <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.029>
- Nakagawa, Y. (2013). Metabolism and biological function of cardiolipin. In *Yakugaku Zasshi* (Vol. 133, Issue 5, pp. 561–574). <https://doi.org/10.1248/yakushi.13-00052>
- Natarajan, K., Singh, S., Burke, T. R., Grunberger, D., & Aggarwal, B. B. (1996). Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(17), 9090–9095. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9090>
- Natarelli, L., Ranaldi, G., Leoni, G., Roselli, M., Guantario, B., Comitato, R., Ambra, R., Cimino, F., Speciale, A., Virgili, F., & Canali, R. (2015). Nanomolar caffeic acid decreases glucose uptake and the effects of high glucose in endothelial cells. *PLoS ONE*, 10(11), e0142421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142421>
- Obrist, F., Michels, J., Durand, S., Chery, A., Pol, J., Levesque, S., Joseph, A., Astesana, V., Pietrocola, F., Wu, S., Castedo, M., & Kroemer, G. (2018). Vulnerability of cisplatin resistant cancers to starvation linked to enhanced dependency on glutamine-derived nucleotides. *The EMBO Journal*, 37(14), e98597.

- Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. In *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 96, Issue 9, pp. 2181–2196). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jps.20874>
- Pablo Bórquez, M., Felipe Capdeville, F., Arturo Madrid, M., Marcelo Veloso, O., & Marcela Cárcamo, P. (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://doi.org/10.4067/s0718-40262011000400003>
- Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., & Ruggiero, F. M. (2001). Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion*, 1(2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/S1567-7249\(01\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S1567-7249(01)00011-3)
- Patlevič, P., Vašková, J., Švorc, P., Vaško, L., & Švorc, P. (2016). Reactive oxygen species and antioxidant defense in human gastrointestinal diseases. *Integrative Medicine Research*, 5(4), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.07.004>
- Pedersen, P. L. (2007a). The cancer cell's "power plants" as promising therapeutic targets: An overview. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 39, Issue 1, pp. 1–12). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9070-5>
- Pedersen, P. L. (2007b). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 39, Issue 3, pp. 211–222). <https://doi.org/10.1007/s10863-007-9094-x>
- Pelinson, L. P., Assmann, C. E., Palma, T. V., da Cruz, I. B. M., Pillat, M. M., Mânica, A., Stefanello, N., Weis, G. C. C., de Oliveira Alves, A., de Andrade, C. M., Ulrich, H., Morsch, V. M. M., Schetinger, M. R. C., & Bagatini, M. D. (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>
- Peredo-Silva, L., Fuentes-Retamal, S., Sandoval-Acuña, C., Pavani, M., Maya, J. D., Castro-Castillo, V., Madrid-Rojas, M., Rebolledo, S., Kemmerling, U., Parra, E., & Ferreira, J. (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>
- Pignon, J. P., Maître, A. le, Maillard, E., & Bourhis, J. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology*, 92(1), 4–14. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.04.014>

- Porporato, P. E., Payen, V. L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C. J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., Feron, O., Michiels, C., Gallez, B., & Sonveaux, P. (2014). A mitochondrial switch promotes tumor metastasis. *Cell Reports*, 8(3), 754–766. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.043>
- Pramanik, K. C., Boreddy, S. R., & Srivastava, S. K. (2011). Role of mitochondrial Electron transport chain complexes in capsaicin mediated oxidative stress leading to apoptosis in pancreatic cancer cells. *PLoS ONE*, 6(5), e20151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020151>
- Prasetyanti, P. R., & Medema, J. P. (2017). Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. In *Molecular Cancer* (Vol. 16, Issue 1, p. 41). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0600-4>
- Puleston, D. (2015). Detection of mitochondrial mass, damage, and reactive oxygen species by flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(9), 830–834. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot086298>
- Pustynnikov, S., Costabile, F., Beghi, S., & Facciabene, A. (2018). Targeting mitochondria in cancer: current concepts and immunotherapy approaches. In *Translational Research* (Vol. 202, pp. 35–51). Mosby Inc. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.07.013>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Rajendra Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Venkata Reddy, B. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 349(1–2), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0655-7>
- 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://doi.org/10.1016/j.piro.2015.02.015>
- Rodríguez-Enríquez, S., Gallardo-Pérez, J. C., Marín-Hernández, Á., & Moreno-Sánchez, R. (2012). The Warburg Hypothesis and the ATP Supply In Cancer Cells Is Oxidative Phosphorylation impaired in malignant neoplasias? *Undefined*.
- Ross, M. F., Kelso, G. F., Blaikie, F. H., James, A. M., Cochemé, H. M., Filipovska, A., Da Ros, T., Hurd, T. R., Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2005). Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry (Moscow)*, 70(2), 222–230. <https://doi.org/10.1007/s10541-005-0104-5>

- Ross, M. F., Kelso, G. F., Blaikie, F. H., James, A. M., Cocheme, H. M., Filipovska, A., Ros, T. D., Hurd, T. R., Smith, R. A. J., & Murphy, M. P. (2005). Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biokhimiya*, *70*(2), 273–283.
- Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S. J., & Capaldi, R. A. (2004). Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Research*, *64*(3), 985–993. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-1101>
- Rowe, I., & Boletta, A. (2013). Mitochondrial Transmembrane Potential (ψ_m) Assay Using TMRM. *BIO-PROTOCOL*, *3*(23). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.987>
- Rybinski, B., & Yun, K. (2016). Addressing intra-tumoral heterogeneity and therapy resistance. In *Oncotarget* (Vol. 7, Issue 44, pp. 72322–72342). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11875>
- Rzepecka-Stojko, A., Kabala-Dzik, A., Mozdierz, A., Kubina, R., Wojtyczka, R. D., Stojko, R., Dziedzic, A., Jastrzebska-Stojko, Z., Jurzak, M., Buszman, E., & Stojko, J. (2015). Caffeic acid Phenethyl ester and ethanol extract of Propolis induce the complementary Cytotoxic effect on triple-negative breast cancer cell lines. *Molecules*, *20*(5), 9242–9262. <https://doi.org/10.3390/molecules20059242>
- Sandoval-Acuña, C., Fuentes-Retamal, S., Guzmán-Rivera, D., Peredo-Silva, L., Madrid-Rojas, M., Rebolledo, S., Castro-Castillo, V., Pavani, M., Catalán, M., Maya, J. D., Jara, J. A., Parra, E., Calaf, G. M., Speisky, H., & Ferreira, J. (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>
- Santelices Ch., M. J., Cárcamo I., M., Brenner A., C., & Montes F., R. (2016). Cáncer oral en Chile. Revisión de la literatura. In *Revista Medica de Chile* (Vol. 144, Issue 6, pp. 766–770). Sociedad Medica de Santiago. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872016000600011>
- Sarniak, A., Lipińska, J., Tytman, K., & Lipińska, S. (2016). Endogenne mechanizmy powstawania reaktywnych form tlenu (ROS). In *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej* (Vol. 70, pp. 1150–1165). Polska Akademia Nauk. <https://doi.org/10.5604/17322693.1224259>
- Scarpulla, R. C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1813, Issue 7, pp. 1269–1278). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>
- Serafim, T. L., Carvalho, F. S., Marques, M. P. M., Calheiros, R., Silva, T., Garrido, J., Milhazes, N., Borges, F., Roleira, F., Silva, E. T., Holy, J., & Oliveira, P. J. (2011). Lipophilic caffeic and ferulic acid derivatives presenting cytotoxicity against human breast cancer cells. *Chemical Research in Toxicology*, *24*(5), 763–774. <https://doi.org/10.1021/tx200126r>

- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A., & Cantley, L. C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(10), 3329–3335. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308061100>
- Shoshan-Barmatz, V., N. Maldonado, E., & Krelin, Y. (2017). VDAC1 at the crossroads of cell metabolism, apoptosis and cell stress. *Cell Stress*, *1*(1), 11–36. <https://doi.org/10.15698/cst2017.10.104>
- Sidoryk, K., Jaromin, A., Filipczak, N., Cmoch, P., & Cybulski, M. (2018). Synthesis and antioxidant activity of caffeic acid derivatives. *Molecules*, *23*(9). <https://doi.org/10.3390/molecules23092199>
- Silva, T., Oliveira, C., & Borges, F. (2014). Caffeic acid derivatives, analogs and applications: A patent review (2009-2013). In *Expert Opinion on Therapeutic Patents* (Vol. 24, Issue 11, pp. 1257–1270). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.959492>
- SK, J. (2012). Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *TheScientificWorldJournal*, *2012*. <https://doi.org/10.1100/2012/372345>
- Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., & Lan Bo Chen. (1991). Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(9), 3671–3675. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3671>
- Song, M., Wu, H., Wu, S., Ge, T., Wang, G., Zhou, Y., Sheng, S., & Jiang, J. (2016). Antibiotic drug levofloxacin inhibits proliferation and induces apoptosis of lung cancer cells through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *84*, 1137–1143. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.034>
- Steinberg, G. R., & Kemp, B. E. (2009). AMPK in health and disease. In *Physiological Reviews* (Vol. 89, Issue 3, pp. 1025–1078). Physiol Rev. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2008>
- Stewart, J. A., Heo, G., Glover, K. E., Williamson, P. C., Lam, E. W., & Major, P. W. (2001). Factors that relate to treatment duration for patients with palatally impacted maxillary canines. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics: Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, *119*(3), 216–225. <https://doi.org/10.1067/mod.2001.110989>
- Takai, E. ., Hirano, A. ., & Shiraki, K. (2011). *Effects of Alkyl Chain Length of Gallate on Self-Association and Membrane Binding* . *Journal of Biochemistry*, *150*(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21508039/>

- Tan, Z., Luo, X., Xiao, L., Tang, M., Bode, A. M., Dong, Z., & Cao, Y. (2016). The role of PGC1 α in cancer metabolism and its therapeutic implications. In *Molecular Cancer Therapeutics* (Vol. 15, Issue 5, pp. 774–782). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0621>
- Tang, J. Y., Li, L. J., Ou-Yang, F., Wang, C. L., Shu, C. W., Wu, K. H., Wang, H. R., Yen, C. H., Cheng, Y. Bin, & Chang, H. W. (2019). Ethyl Acetate Extract of *Nepenthes ventricosa* x *maxima* Exerts Preferential Killing to Oral Cancer Cells. *DNA and Cell Biology*, 38(8), 763–772. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4436>
- Tomizawa, A., Kanno, S. I., Osanai, Y., Goto, A., Sato, C., Yomogida, S., & Ishikawa, M. (2013). Induction of apoptosis by a potent caffeic acid derivative, caffeic acid undecyl ester, is mediated by mitochondrial damage in NALM-6 human B cell leukemia cells. *Oncology Reports*, 29(2), 425–429. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2163>
- Trendeleva, T. A., Sukhanova, E. I., Rogov, A. G., Zvyagilskaya, R. A., Seveina, I. I., Ilyasova, T. M., Cherepanov, D. A., & Skulachev, V. P. (2013). Role of charge screening and delocalization for lipophilic cation permeability of model and mitochondrial membranes. *Mitochondrion*, 13(5), 500–506. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.10.006>
- Tyszka-Czochara, M., Bukowska-Strakova, K., Kocemba-Pilarczyk, K. A., & Majka, M. (2018). Caffeic acid targets AMPK signaling and regulates tricarboxylic acid cycle anaplerosis while metformin downregulates HIF-1 α -induced glycolytic enzymes in human cervical squamous cell carcinoma lines. *Nutrients*, 10(7), 841. <https://doi.org/10.3390/nu10070841>
- Tyszka-Czochara, M., Konieczny, P., & Majka, M. (2017a). Caffeic acid expands anti-tumor effect of metformin in human metastatic cervical carcinoma HTB-34 cells: Implications of AMPK activation and impairment of fatty acids de novo biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 462. <https://doi.org/10.3390/ijms18020462>
- Tyszka-Czochara, M., Konieczny, P., & Majka, M. (2017b). Caffeic acid expands anti-tumor effect of metformin in human metastatic cervical carcinoma HTB-34 cells: Implications of AMPK activation and impairment of fatty acids de novo biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 462. <https://doi.org/10.3390/ijms18020462>
- Van Der Blik, A. M., Sedensky, M. M., & Morgan, P. G. (2017). Cell biology of the mitochondrion. *Genetics*, 207(3), 843–871. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300262>
- Viostat, B., Nguyen-Huy Dung, Rodier, N., & Bentefrit, F. (1995). Chlorure de cis-Chloro(diméthyl sulfoxyde)(metformine)platine(II). *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, 51(5), 878–880. <https://doi.org/10.1107/s0108270194009674>

- Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondria and Cancer. In *Cell* (Vol. 166, Issue 3, pp. 555–566). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002>
- Watabe, M., Hishikawa, K., Takayanagi, A., Shimizu, N., & Nakaki, T. (2004). Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Apoptosis by Inhibition of NFκB and Activation of Fas in Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 6017–6026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306040200>
- Wilkins, L. R., Brautigan, D. L., Wu, H., Yarmohammadi, H., Kubicka, E., Serbulea, V., Leitinger, N., Liu, W., & Haaga, J. R. (2017). Cinnamic Acid Derivatives Enhance the Efficacy of Transarterial Embolization in a Rat Model of Hepatocellular Carcinoma. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 40(3), 430–437. <https://doi.org/10.1007/s00270-016-1515-y>
- Wong, T., & Wiesenfeld, D. (2018). Oral Cancer. *Australian Dental Journal*, 63, S91–S99. <https://doi.org/10.1111/adj.12594>
- Wu, J., Omene, C., Karkoszka, J., Bosland, M., Eckard, J., Klein, C. B., & Frenkel, K. (2011). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), derived from a honeybee product propolis, exhibits a diversity of anti-tumor effects in pre-clinical models of human breast cancer. *Cancer Letters*, 308(1), 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.04.012>
- Xiao, D., Powolny, A. A., & Singh, S. V. (2008). Benzyl isothiocyanate targets mitochondrial respiratory chain to trigger reactive oxygen species-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 30151–30163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802529200>
- Yang, C., Zhao, J., Pei, W., Zheng, X., & Rong, J. (2014). Biochemical mechanisms of bornyl caffeate induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 219, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.05.018>
- Yang, Yixin, Chen, D., Liu, H., & Yang, K. (2019). Increased expression of lncRNA CASC9 promotes tumor progression by suppressing autophagy-mediated cell apoptosis via the AKT/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death and Disease*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1280-8>
- Yang, Yuhui, Karakhanova, S., Hartwig, W., D'Haese, J. G., Philippov, P. P., Werner, J., & Bazhin, A. V. (2016). Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 231, Issue 12, pp. 2570–2581). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.25349>
- Yoshida, G. J. (2015). Metabolic reprogramming: The emerging concept and associated therapeutic strategies. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 34, Issue 1, p. 111). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0221-y>

- Yu, H. J., Shin, J. A., Yang, I. H., Won, D. H., Ahn, C. H., Kwon, H. J., Lee, J. S., Cho, N. P., Kim, E. C., Yoon, H. J., Lee, J. Il, Hong, S. D., & Cho, S. D. (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>
- Yuan, H. X., Xiong, Y., & Guan, K. L. (2013). Nutrient Sensing, Metabolism, and Cell Growth Control. In *Molecular Cell* (Vol. 49, Issue 3, pp. 379–387). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.019>
- Zhang, J., Späth, S. S., Marjani, S. L., Zhang, W., & Pan, X. (2018). Characterization of cancer genomic heterogeneity by next-generation sequencing advances precision medicine in cancer treatment. *Precision Clinical Medicine*, *1*(1), 29–48. <https://doi.org/10.1093/pcmedi/pby007>
- Zhang, Y.-X., Yu, P.-F., Gao, Z.-M., Yuan, J., & Zhang, Z. (n.d.). *Caffeic acid n-butyl ester against lung cancer cell line A549*.
- Zhao, X., Cai, A., Peng, Z., Liang, W., Xi, H., Li, P., Chen, G., Yu, J., & Chen, L. (2019). JS-K induces reactive oxygen species-dependent anti-cancer effects by targeting mitochondria respiratory chain complexes in gastric cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(4), 2489–2504. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14122>
- Zong, W. X., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. In *Molecular Cell* (Vol. 61, Issue 5, pp. 667–676). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>