

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS (ICOD)**

**“VIABILIDAD CELULAR DE CÉLULAS TUMORALES EN UN MODELO *IN VITRO*  
O EFECTO ANTITUMORAL *IN VIVO* CUANDO SE EMPLEA EL USO DE  
ACEITES ESENCIALES COMO TERAPIA DE REEMPLAZO O COADYUVANTE  
COMPARADO CON LA TERAPIA TRADICIONAL PARA CÁNCER ORAL:  
REVISIÓN SISTEMÁTICA CUALITATIVA”**

**Grace Escarlett Celis Correa**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REQUISITO  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE CIRUJANO-  
DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Mario Díaz Dosque**

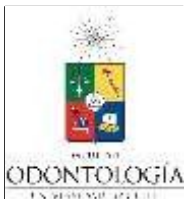
**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. José Jara Sandoval**

**Dr. Rodrigo Cabello Ibacache**

**Adscrito a Proyecto FIA Código PYT-2017-0853  
Santiago - Chile  
2020**





UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ICOD ÁREA QUÍMICA

**“VIABILIDAD CELULAR DE CÉLULAS TUMORALES EN UN MODELO *IN VITRO*  
O EFECTO ANTITUMORAL *IN VIVO* CUANDO SE EMPLEA EL USO DE  
ACEITES ESENCIALES COMO TERAPIA DE REEMPLAZO O COADYUVANTE  
COMPARADO CON LA TERAPIA TRADICIONAL PARA CÁNCER ORAL:  
REVISIÓN SISTEMÁTICA CUALITATIVA”**

**Grace Escarlett Celis Correa**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN REQUISITO  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE CIRUJANO-  
DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Mario Díaz Dosque**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dr. José Jara Sandoval**

**Dr. Rodrigo Cabello Ibacache**

**Adscrito a Proyecto FIA Código PYT-2017-0853  
Santiago - Chile  
2020**

Dedicado a todos quienes de alguna manera formaron parte de este periodo de mi vida, tanto a mi familia como amigos.

## **Agradecimientos**

Agradezco enormemente a mis tutores, Dr. Mario Diaz, Dr. José Jara y Dr. Rodrigo Cabello por permitirme trabajar en este Proyecto, por sus revisiones, sugerencias y su apoyo a través de este proceso, por estar siempre disponible para enseñarme algo nuevo y compartir alguna entretenida conversación, ya sea de manera presencial o por videollamada.

A todos mis amigos por estar siempre con una palabra de aliento y mandándome buenas vibras a la distancia en estos tiempos extraños de la cuarentena junto con el apoyo moral y afectivo durante este proceso y periodo de mi vida universitario.

A mi familia por estar siempre presente, por su cariño incondicional y por aguantarme.

¡Gracias!

## Índice

RESUMEN	6
1. MARCO TEÓRICO	7
1.1 Generalidades del Cáncer oral	7
1.2 Tratamientos en cáncer oral	9
1.3 Generalidades de aceites esenciales	11
1.4 Aceite esencial y odontología	14
1.5 Cáncer y aceites esenciales	15
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
3.OBJETIVO GENERAL	17
3.1 Objetivos específicos	17
4.METODOLOGÍA	18
4.1	Tipo de estudio
18	
4.2 Estrategia de recolección de información	18
4.3 Evaluación metodológica	18
4.4 Extracción de los resultados	19
4.5 Análisis de resultados	19
5.RESULTADOS	19
5.1 Búsqueda , extracción y selección de estudios	19
5.2 Análisis de los estudios incluidos	23
5.2.1 Estudios incluidos sin control positivo	23
5.2.2 Estudios incluidos con control positivo	26
5.2.3 Metodología de los estudios incluidos	28
5.2.4 Recapitulación de estudios incluidos en la revisión sistemática cualitativa	
.....	31
6. DISCUSIÓN	35
6.1 Métodos de obtención del Aceite esencial	35
6.2 Actividad citotóxica de los aceites esenciales	36
6.3 Concentración inhibitoria media de los Aceites Esenciales	43
7.CONCLUSIÓN	46
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9. ANEXOS Y APÉNDICES	61

**RESUMEN:**

**Introducción:** El cáncer oral es un problema de salud a nivel Mundial, así como en Chile, debido a su desfavorable sobrevida y creciente resistencia a los quimioterapéuticos actuales. Por lo anterior, se está constantemente en búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos con el fin de poder mejorar la calidad de vida, reducir síntomas y aumentar la supervivencia de los pacientes. En este sentido el uso de aceites esenciales puede ser una gran alternativa, reportando efectos positivos sobre distintos tipos de cáncer.

El presente estudio recopila la información disponible que evidencia la diferencia en la viabilidad celular de células tumorales en un modelo *in vitro* o efecto antitumoral *in vivo* cuando se emplea el uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante comparado con la terapia tradicional para cáncer oral.

**Material y métodos:** Se realizó una búsqueda sistemática de la literatura científica en Pubmed, Scielo, EBSCO, ISI Web of Science y Science Direct. Entre los años 2005-2020. Las palabras claves fueron: aceites esenciales, aceites volátiles, cáncer oral, antineoplásico, antiproliferativo, viabilidad celular con limitación de idioma en español, inglés, portugués y francés. Se seleccionaron los artículos por título y resumen que cumplieran con el criterio de inclusión del uso de aceites esenciales, que midieran viabilidad celular en cáncer oral, ya sea en un modelo *in vitro* o modelo animal.

**Resultados:** La búsqueda inicial identificó a 266 artículos potenciales. De estos fueron excluidos 242 luego de una selección por título y resumen. Después de revisar el documento completo de 24 publicaciones, 8 fueron excluidos por no cumplir con el estándar mínimo en la evaluación metodológica. Quedaron un total de 16 artículos incluidos. Solo se encontraron estudios *in vitro*, los que fueron publicados entre los años 2006 y 2020.

**Conclusiones:** Sobre la base de la información disponible, se puede concluir que existen diferencias en la viabilidad celular de células tumorales en modelo *in vitro* cuando se emplea el uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante comparado con la terapia tradicional para cáncer oral. Los aceites esenciales son eficaces en inhibir la viabilidad celular pero no en un 100%.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Generalidades del Cáncer oral

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define cáncer como *“la proliferación anormal y descontrolada de células anormales que invaden tejidos y órganos más allá de sus límites habituales y distantes, que pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso denominado metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer.”*(OMS, n.d) El proceso de metástasis es largo y complejo, ya que primero las células cancerosas pueden invadir un tejido cercano, para luego llegar a un vaso sanguíneo o linfático e invadir otro sitio. El cáncer es la segunda causa de muerte, responsable de 1 de cada 8 muertes en el mundo por día. Para el año 2030 se estima que el número de muertes aumentará a más de 11 millones de personas por año a nivel mundial. (GLOBOCAN, 2017).

Entre los tipos de cáncer más frecuentes se encuentran: el cáncer de mama, el de próstata, el de pulmón, de estómago, de hígado y el de cabeza y cuello (Begnini y cols, 2014). Se ha estimado que el 3% de todos los cánceres se localizan en la cavidad oral (Mark, 2016).

### Cáncer Oral

El cáncer oral (CO) se origina en cualquier tejido de la cavidad oral, pudiendo presentarse en labios, comisura, mejillas, piso de boca, lengua, paladar duro o istmo de las fauces (García y Bascones,.2009). Las principales localizaciones son lengua y piso de boca. Existen distintos tipos de neoplasias malignas en la cavidad oral, pero el 90% de estas son carcinoma oral de células escamosas (D’souza y Addepalli, 2018).

Los factores de riesgo más asociados al cáncer oral son el tabaco y el alcohol, los cuales tienen un efecto sinérgico incrementando el riesgo de padecer este cáncer entre 6 a 15 veces. La edad es considerada como factor de riesgo ya que el 90 % de los casos diagnosticados son en pacientes de más de 45 años (Riera y Martínez, 2005). Otros factores de riesgo son la exposición a la radiación ultravioleta (UV)



principalmente en casos de cáncer de labio. También está implicado en la carcinogénesis oral el Virus de Papiloma Humano (VPH), el cual a través de su genoma viral alteraría el ciclo celular, siendo los VPH 16 y 18 los principales tipos asociados (Kumar y cols., 2016).

Existen presentaciones clínicas que conllevan un riesgo de desarrollo de cáncer en la cavidad oral, conocidas como desórdenes potencialmente malignos (DPM), en Chile, las más frecuentes son: el liquen plano oral, leucoplasia, queilitis actínica y eritroplasia (Valdivia y cols., 2015). También existen las displasias epiteliales (DE), alteraciones en la maduración y proliferación celular. Las DE se pueden clasificar en lesiones de bajo grado y alto grado, según la extensión de la alteración (Adel K. El-Naggar y cols., 2017). Las DE y la presencia de aneuploidía son indicadores de riesgo de progresión a cáncer oral (Bradley y cols., 2010).

### **Epidemiología**

Existe una variabilidad geográfica con una mayor prevalencia en América del Sur, Sudeste asiático y sobre todo en India, en la cual el cáncer oral representa el 40% de todos los tumores malignos (García y Bascones, 2009). Según datos de GLOBOCAN 2018, el número de nuevos casos para ese año fue de 354.864 considerando ambos sexos y todas las edades. La incidencia de cáncer oral/labio es de 4 por 100.000 habitantes. Siendo mayor en hombres, con 5,8 por 100.000 habitantes que en mujeres con 2,3 por 100.000 habitantes. En el reporte del año 2018, el cáncer oral y de labio se encuentra en el decimoquinto puesto en mortalidad entre todos los cánceres a nivel mundial (GLOBOCAN, 2018).

En Chile existen pocos estudios respecto al cáncer oral, y en su mayoría se presentan datos en conjunto al cáncer de faringe. De acuerdo con los "Registros poblacionales de Cáncer en Chile" para el período 2003-2007, la incidencia estimada de cáncer de la cavidad oral y faringe fue de 3,2 casos nuevos por 100.000 hombres y de 1,2 casos nuevos por 100.000 mujeres. La región con el mayor número de casos, para hombres y mujeres, fue la de Antofagasta, con 4,2 casos nuevos por 100.000 hombres y 2,6 casos nuevos por 100.000 mujeres. Según la localización, el cáncer que presentó mayor frecuencia fue el cáncer de lengua,

seguido por el piso de boca, glándulas mayores, encía y labio; siendo las personas de sexo masculino las más afectadas. Según Riera y Martínez (2005) plantearon que la morbilidad por cáncer oral y faríngeo corresponde a 1,6% del total de cánceres y la razón entre hombres y mujeres es de 2,3:1 (Santelices y cols.,2016). El único estudio referido a mortalidad exclusivamente por cáncer oral en Chile reporta una tasa bruta total de 0,89 muertes por 100.000 habitantes (1,13 para los hombres, 0,66 para las mujeres) en el periodo 2002-2012 (Candia y cols., 2018).

En una investigación realizada por el Instituto Nacional del Cáncer se observó que la sobrevida del cáncer oral a los 5 años fue 56,9% y a 10 años fue 46,3% (Bórquez y cols.,2011). Las lesiones ubicadas en el labio inferior, presentó una mayor sobrevida versus otras regiones anatómicas, con un promedio de 11,3 años, mientras que para lengua y piso de boca fue de 5 años y para mejilla es 4,6 años. A los 5 años, las mujeres tienen una sobrevida de 56,6% y los hombres de 38,3% (Santelices y cols., 2016).

## **1.2 Tratamientos en cáncer oral**

El diagnóstico y el tratamiento tempranos siguen siendo la clave para mejorar la supervivencia de los pacientes con CO. Las opciones de tratamiento dependen de distintos factores, entre ellos, el tipo y estadio del cáncer, efectos secundarios, preferencia y el estado general de salud del paciente.

El estadio del CO nos permitirá tener una visión más macro de qué tratamientos se pueden realizar. El sistema de estadiaje de TNM (tumor-Nódulo-metástasis), es un sistema anatómico a través del cual se describe la extensión, a nivel anatómico, del tumor primario, así como si ha afectado a nivel de los nódulos linfáticos y si ha producido metástasis a distancia (UICC, 2017) (Anexo 1).

Solo el 40% de los pacientes diagnosticados con CO presentan estadio I o II y puede tratarse con una sola modalidad de tratamiento (cirugía o radioterapia). El 60% restante de los pacientes tiene enfermedad localmente avanzada, recurrente o metastásica y utilizan un tratamiento multimodal (Rajendra y cols., 2020).

El tratamiento de primera elección es la cirugía o radioterapia, usados por separado o en combinación con quimioterapia en estadios avanzados. La cirugía es utilizada en el 95% de los casos de cáncer oral detectados de manera temprana (Yusuf y cols., 2019). En la cirugía se extirpa el tumor y parte del tejido sano circundante, conocido como margen. Se busca la extirpación completa del tumor con "márgenes negativos", esto significa que no haya rastros de cáncer en el tejido sano del margen (Antón y Pérez, 2015).

La radioterapia, consiste en dirigir rayos gamma de alta frecuencia a una zona cuyo tamaño y volumen se determinan por adelantado. Es, por tanto, un tratamiento local que hace posible la destrucción selectiva de las células cancerosas, mediante la ruptura de sus cromosomas principalmente (García Kass y cols., 2013; Hurtado y Estrada, 2012). La dosis de radioterapia va a depender de la localización y tipo de tumor, además de si la radiación va a ser usada de forma única o en combinación con otras modalidades. Normalmente, las dosis de radiación en un paciente con cáncer de cabeza y cuello llegan hasta 50-70 Gy ( $J\ kg^{-1}$ ) (Antón y Pérez, 2015). En un estudio presentado por S. Cooper, se llegó a la conclusión de que la radioterapia y la quimioterapia mejoran significativamente el control loco-regional, además de aumentar la supervivencia. Sin embargo, el tratamiento combinado de radioterapia y cisplatino (quimioterapéutico) aumenta los efectos adversos. En muchos estudios que comparan tanto la cirugía como la radioterapia, se ha observado que la supervivencia depende del estadio en el que se encuentra la enfermedad cuando se diagnostica (Antón y Pérez, 2015; García y cols., 2013). Pero, la radioterapia tiene también complicaciones graves que afectan a estructuras orales como glándulas salivales, hueso, dentición y mucosa oral, entre otros, provocando en el paciente consecuencias clínicas como mucositis, xerostomía, osteorradionecrosis y caries por radiación (Hurtado y Estrada, 2012).

La quimioterapia se fundamenta en el uso de fármacos contra el cáncer suministrados vía intravenosa o vía oral. Estos medicamentos ingresan en el torrente sanguíneo y pueden llegar al cáncer que se ha propagado a los órganos más allá de la cabeza y del cuello, ayudando a detener o hacer más lento el

crecimiento de las células cancerosas, las cuales crecen y se dividen con rapidez (Silvestre y Puente, 2008).

Los quimioterapéuticos que se utilizan con mayor frecuencia para el cáncer de la cavidad oral y de la orofaringe son: Cisplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), carboplatino, paclitaxel (Rajendra y cols., 2020). La nefrotoxicidad del cisplatino es uno de los efectos adversos más significativos limitando la dosis que se puede administrar y su eficiencia. El éxito del cisplatino como antineoplásico se ha visto limitado por la resistencia intrínseca o adquirida (después de varios ciclos de quimioterapia) de las células tumorales (Gosepath y cols., 2008; Kasahara y cols., 2019).

El CO sigue siendo un problema de salud tanto en Chile como a nivel Mundial, ya que recientemente existe una resistencia a los quimioterapéuticos, sobre todo en cáncer oral de tipo metastásico y refractario, por lo que se está constantemente en búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos con el fin de poder mejorar la calidad de vida, reducción de síntomas y la supervivencia de los pacientes (Gosepath y cols., 2008). En este sentido el uso de aceites esenciales puede ser una gran alternativa, ya que ha reportado efectos sobre distintos tipos de cáncer.

### **1.3 Generalidades de aceites esenciales**

A lo largo de la historia de la humanidad las plantas han cumplido un papel relevante no solo por su capacidad de fotosíntesis para la producción de oxígeno, sino también por sus cualidades de mantener y mejorar la salud de la población de las diferentes culturas. Las plantas tienen fitoquímicos, compuestos químicos producidos por ellas, los cuales tienen características curativas que han sido utilizados por siglos (Ahmad y cols., 2013). La medicina tradicional China con más de 4000 años de antigüedad, se basa en el uso de fitoterapia (prevención y tratamiento de enfermedades a través de productos de origen vegetal), existiendo una alta valoración del uso de plantas por parte de la población junto con un gran número de medicamentos fabricados a partir de más de 7000 especies de plantas medicinales (Ardila Jaimes, 2015). La medicina natural comenzó a adquirir un carácter científico en la Grecia de Hipócrates, usando el extracto de corteza de sauce para el tratamiento de fiebre y dolor. Después de 2000 años en 1828, el

farmacéutico Buchner extrajo de la corteza de sauce (*Salix Alba*), el ácido acetilsalicílico (Ramírez, Plana y Ferrandiz, 1999; Zermeño, 2004). El empleo del clavo de olor como analgésico se ha informado desde el siglo XIII, principalmente para el dolor bucodental, siendo el eugenol el principal principio activo responsable de otorgarle propiedades analgésicas y anestésicas para el uso tópico antiinflamatorio y antiséptico (Cortés-Rojas y cols., 2014). En Chile, contamos con farmacias mapuches que forma parte de un proyecto de fomento intercultural que busca relacionar los conceptos herbolarios y culturales mapuche, en beneficio de la salud de la comunidad en general, actuando como medicina complementaria (Errázuriz y cols., 2006). La importancia de los ingredientes activos de las plantas en la agricultura y la medicina han estimulado el interés científico significativo en las actividades biológicas de estas sustancias. Es por esto por lo que en la actualidad se realizan investigaciones exhaustivas para mejorar nuestro conocimiento sobre sus constituyentes y propiedades medicinales, mecanismo de acción, evaluación de seguridad y estudios toxicológicos (Ahmad y cols., 2013).

Muchas plantas de uso comestible tienen un efecto medicinal, algunos ejemplos de estas son: canela, tomillo, romero, laurel, eucalipto, orégano, albahaca, etc. De estas plantas se pueden extraer aceites esenciales (AE), que se definen como "*aceites volátiles o esencias derivadas de la vegetación y caracterizados por olores distintivos y una medida sustancial de resistencia a la hidrólisis*" (Leyva y cols., 2017), según la norma ISO 9235.2 indica que los AE son un "Producto obtenido a partir de materia prima vegetal, ya sea por destilación con agua o vapor, por un proceso mecánico, o por destilación seca" (Stratakos y Koidis, 2016). El AE obtenido por método físico es puro, sin contaminantes externos por lo tanto es el método extracción más seguro para aplicaciones biomédicas, caso contrario al usar un método químico que aprovecha la condición apolar de sus componentes, utilizando un solvente para su extracción, pero conlleva una contaminación dejando algunos residuos del solvente o ceras, obteniendo un extracto impuro que no es aceite esencial como tal (Ávalos y Pérez, 2009; ISO, 2013; Paredo, Garcia y Lopez, 2009; Wińska y cols., 2019).

Los AE consisten en una mezcla compleja de compuestos producidos por organismos vivos de origen vegetal, estos se forman en el citoplasma y normalmente están presentes en forma de pequeñas gotas entre las células vegetales y pueden ser obtenidos cuando las paredes de estas células se rompen. Su origen es resultado de metabolitos secundarios productos de tres vías biosintéticas. Sus principales componentes son terpenos, pero también están presente aldehídos, alcoholes y ésteres en menor concentración. La función dentro del sistema ecológico es de mensajeros internos y de protección de las plantas frente al entorno y/o a los herbívoros. Estas capacidades de protección y atracción del medio se ven reflejadas en las propiedades antimicrobiana, antiinflamatorias, antidepressivas, afrodisíacas, antifúngicas, entre otras, presentes en mayor o menor grado en la totalidad de los aceites (Arango y cols., 2012; Asquino y cols., 2016; León y cols., 2015; Silva y cols., 2019).

Los productos sintetizados por los seres vivos en la naturaleza se clasifican principalmente en metabolitos primario y secundarios. Los metabolitos primarios, son aquellos comunes en todas las especies y constituyen los componentes básicos de la vida, que son proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos, teniendo un rol directo en el crecimiento o reproducción. La contribución de este tipo de productos en los aceites esenciales es muy baja solo se encuentran algunos componentes resultado de la degradación de lípidos. Los metabolitos secundarios, son compuestos orgánicos sintetizados por el organismo para defensa contra predadores y patógenos, actúan para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas (Ávalos y Pérez, 2009).

Debido a la gran cantidad de compuestos que poseen los AE, en algunos casos 200 diferentes, conlleva a que la identificación o caracterización de los componentes no sea un proceso simple, en general se utilizan técnicas analíticas de cromatografía de gas o líquida, acoplada a espectrofotometría de masas. La importancia de conocer los AE y sus componentes químicos permite poder medir su aplicabilidad industrial (alimenticia, cosmética o farmacológica) de las esencias se relacionan de manera directa con su composición química, y que a su vez determina todas las

propiedades (Acevedo, Navarro y Montero, 2013). Cabe destacar que los AE difieren mucho en sus composiciones, incluso en plantas de la misma especie, debido a diferentes ubicaciones geográficas, madurez, estación del año, entre otros (Wińska y cols., 2019).

Tabla 1: Algunos ejemplos de aceites esenciales y sus principales componentes:

<b>Aceite esencial</b>	<b>Componentes principales</b>
<i>Laurus nobilis</i> (Laurel)	1,8-cineol; sabineno (Caputo y cols., 2017)
<i>Nigella sativa</i> (comino negro)	Timol, alfa-felandreno (Ahmad y cols., 2013)
<i>Ocimum basilicum</i> (albahaca)	Linalol, metil eugenol (Bassolé y cols., 2010)
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)	Timol, p-cimeno, carvacrol (Kubatka y cols., 2019)
<i>Lavanda officinalis</i> (Lavanda)	Linalol, acetato de linalilo (Marín y cols., 2016)
<i>Origanum vulgare</i> (orégano)	Carvacrol; Timol (Begnini y cols., 2014)

#### 1.4 Aceite esencial y odontología

En odontología los aceites esenciales han sido una alternativa terapéutica para el control de patologías como enfermedad periodontal, donde se ha evidenciado que los AE son eficaces en el control de inflamación y el biofilm supragingival, siendo seguros en su uso con los pacientes. Su efecto bactericida ha quedado probado recientemente por Charles y cols (2000), donde en un modelo *in vitro* demostraron que tienen la capacidad de romper la pared celular de ciertos microorganismos y suprimir su actividad enzimática. Además, pueden inhibir las endotoxinas de patógenos gram-negativos. Los principios activos o terpenos presentes en AE más utilizados para este propósito son timol, eucaliptol y mentol (Asquino y cols., 2016).

Existe otra publicación más reciente, se describe que para el tratamiento endodóntico los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (Romero), *Zingiber officinale* (Jengibre), *Citrus aurantium bergamia* (Bergamota), y *Copaifera officinalis* (Copaiba o palo de aceite) tuvieron efecto contra *Enterococcus faecalis* como medicación intracanal, tanto solo como en combinación con hidróxido

de calcio, el cual es el medicamento intracanal *Gold-* estándar y no es efectivo contra *E. faecalis* (Silva y cols., 2019).

Contra la caries dental, el aceite esencial de limón y limoneno pueden proporcionar una nueva opción de medicamentos para la prevención y el tratamiento de la caries radicular temprana, ya que tienen influencia en el progreso de la caries temprana de la dentina, estabilizando su estructura al inhibir la degradación del colágeno (Ma y cols., 2020).

El AE de *Laurus nobilis Linnaeus* (Laurel) que reporta actividad antifúngica en modelo *in vitro* y su componente principal es 1,8-cineol. Este AE inhibió en *Cándida Albicans* la adhesión y formación de biopelículas. Afectando la pared celular de la levadura y permeabilidad de la membrana (Peixoto y cols., 2017).

### **1.5 Cáncer y aceites esenciales**

Existe evidencia que establece que los aceites esenciales ejercen efectos benéficos en la salud humana por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas y anti proliferativas (Begnini y cols., 2014; Matus, Jorquera y Zúñiga, 2017).

Uno de los mecanismos por los cuales los aceites esenciales ejercerían sus efectos benéficos en la salud humana es el actuar como antioxidantes inactivando los efectos tóxicos de los radicales libres (RL). Los RL en elevadas concentraciones se asocian a daño de las membranas celulares, envejecimiento, enfermedades coronarias y daño en al ADN celular, pudiendo tener un papel fundamental en el cáncer. Los RL son compuestos químicos altamente reactivos que pueden dañar las células, estos se forman de manera natural y permiten muchos procesos normales de las células (Avello y Suwalsky, 2006).

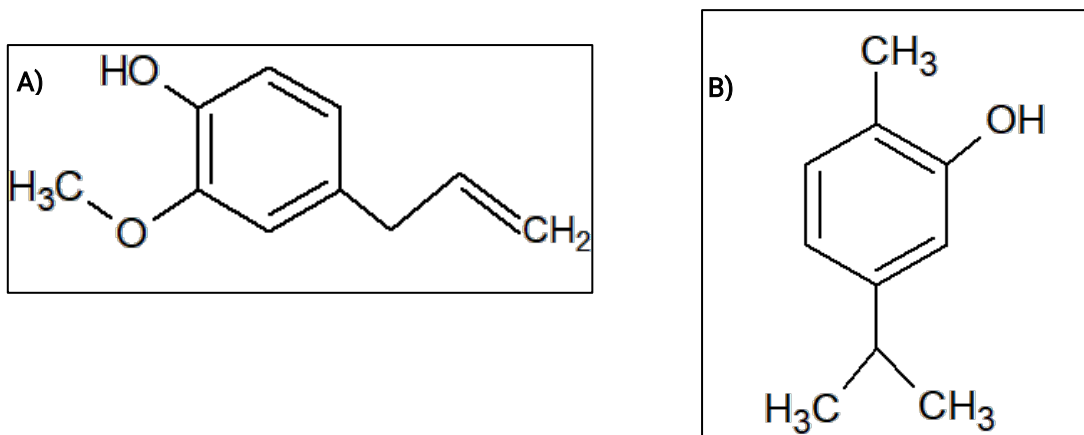
Varios estudios han demostrado que aceites esenciales de orégano, cilantro, eucalipto, comino, albahaca y entre otros, poseen propiedades antioxidantes y pueden actuar como potentes antitumorales (Arango y cols., 2012; Bhalla, Gupta y Jaitak, 2013).

En un estudio realizado por Begnini y cols (2014), determinaron un efecto antiproliferativo del AE de Orégano (*O. Vulgare*) sobre el adenocarcinoma de mama



y de colon. EL AE fue menos eficaz en la línea celular de cáncer de mama, inhibiendo el crecimiento celular en un 48,9% como efecto máximo. Para el cáncer de colón fue más eficaz al inhibir en un 60,8% el crecimiento celular. Sugiriendo que el AE de orégano tendría una actividad selectiva. El eugenol principal componente del aceite esencial de albahaca, nuez moscada, canela y laurel ha mostrado tener actividad anti-proliferativa en diversas líneas celulares de cáncer y modelos animales(Bhalla, Gupta y Jaitak, 2013) (Figura 1).

Algunos monoterpenos presentes en los aceites esenciales serían inhibidores efectivos del proceso de carcinogénesis actuando a diferentes niveles moleculares y celulares. Por ejemplo, el carvacrol es un fenol, monoterpeno principal en la composición del AE de orégano y del tomillo, el que presenta propiedades antiproliferativas dosis dependiente en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, A549, células de leucemia mieloide crónica, K562, células Hep-2, y células de cáncer de mama metastásico humano(Arcila y cols, 2004; Sharifi-Rad y cols., 2018). En un estudio de Yin y cols. en 2012 se evidenció que el carvacrol tiene un efecto proapoptótico y antiproliferativo en el carcinoma hepatocelular a través de la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno en células HepG-2 (Yin y cols., 2012)(Figura 1).



**Figura 1: Estructura química de Eugenol (A) y Carvacrol (B).**

El alcohol perílico es un monoterpeno presente en los aceites esenciales de lavandina (*Lavandula hybrida*) y menta verde o hierbabuena (*Mentha spicata*). Este induce la apoptosis en células tumorales sin afectar a las células normales, además,

se ha demostrado que inhibe el crecimiento en células de cáncer de mama e induce su apoptosis, junto con tener un efecto sinérgico con cisplatino (Yeruva y cols., 2010).

Debido a lo anteriormente descrito de los aceites esenciales y su efecto en distintos tipos de cáncer, en cuanto a la inhibición de la viabilidad celular o su efecto antitumoral en estudios *in vivo*, junto con los estudios que muestran que en infecciones orales son bien tolerados, es que en el presente estudio se recopilará la información disponible para evidenciar su posibilidad de uso en una patología relevante en el ámbito de la odontología como lo es el cáncer oral, con el fin de poder mejorar a futuro la calidad de vida, reducción de síntomas, efectos adversos, la supervivencia de los pacientes y buscar alternativas terapéuticas para la creciente resistencia de los tratamientos antineoplásicos.

## **2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existen diferencias en la viabilidad celular de células tumorales en un modelo *in vitro* o efecto antitumoral *in vivo* cuando se emplea el uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante comparado con la terapia tradicional de para cáncer oral?

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Establecer si existen diferencias en la viabilidad celular de células tumorales en un modelo *in vitro* o efecto antitumoral *in vivo* cuando se emplea el uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante comparado con la terapia tradicional para cáncer oral.

### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar efectos en la viabilidad celular del uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante para cáncer oral.
2. Determinar el efecto antitumoral *in vivo* del uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante para cáncer oral.
3. Determinar efectos en la viabilidad celular de las terapias tradicionales.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Tipo de estudio

Para llevar a cabo este estudio de revisión sistemática cualitativa se realizó una búsqueda sistemática de la literatura científica.

### 4.2 Estrategia de recolección de información

La búsqueda se efectuó utilizando los siguientes buscadores digitales: Pubmed, Scielo, EBSCO, ISI Web of Science y Science Direct. Las palabras claves que se utilizaron para esto fueron: aceites esenciales, aceites volátiles, cáncer oral, antineoplásico, antiproliferativo, viabilidad celular. Se ejecutó la búsqueda con criterios "MeSH" (*Medical Subject Headings*) y DEC's junto con operadores booleanos: "AND", "OR", "NOT". Se aceptó publicaciones de los últimos 15 años, con limitación de idioma en español, inglés, portugués y francés. Se seleccionaron aquellos artículos por título y resumen que cumplieran con el criterio de inclusión del uso de aceites esenciales, que midieran viabilidad celular en cáncer oral, ya sea en un modelo *in vitro* o modelo animal. Los títulos y resúmenes de los artículos fueron revisados de manera independiente por dos autores, en caso de discrepancia se consultó con un tercer revisor para la decisión final y/o se realizó la lectura completa del artículo. Se eliminaron aquellos que estaban duplicados.

### 4.3 Evaluación metodológica

Se utilizaron pautas *ARRIVE* y pauta *CONSORT* para la evaluación metodológicas de los estudios con el fin de que cumplieran con un estándar mínimo.

La pauta para evaluación *in vitro* en la actualidad no existe por lo que se utilizó una adaptación de la pauta *CONSORT* (*Consolidated Standards of Reporting Trials*). La pauta contiene 25 ítems, agrupados en 6 dominios (Título y resumen, introducción, metodología, resultados, discusión y otra información) estos representan los puntos más importantes que debieran estar incluidos en todos los reportes de ensayos clínicos aleatorizados. La estructura metodológica del estudio *in vitro* y el ensayo clínico son similares. En otras palabras, es un ensayo realizado en un laboratorio. Los méritos de los estudios *in vitro* en comparación con los de un ensayo incluyen: Control sobre variables independientes y sesgos imprevistos y facilidad de

operación. En la estructura convencional de un estudio *in vitro*, no se presentan elementos como el cálculo del tamaño de la muestra, la diferencia significativa y la aleatorización (Cartes y Moraga, 2016; Krithikadatta, Gopikrishna y Datta, 2014) (Anexo 2 y 3).

La pauta *ARRIVE "Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments"* fue publicada en el 2010 con el fin de asegurar la calidad de los estudios con animales, cumpliendo estándares científicos, desde el planteamiento hasta la publicación de sus resultados. En efecto se ha comprobado que muchos de estos estudios tienen una calidad inadecuada del reporte, lo que va en desmedro de la valoración, replicación y uso de sus resultados. La pauta contiene 20 ítems agrupados en 5 dominios (Título y resumen, introducción, métodos, resultados, discusión) (Cartes y Moraga, 2016) (Anexo 4).

#### **4.4 Extracción de los resultados**

De los estudios que se seleccionaron se extrajo la información de la planta de donde proviene el aceite esencial, principal componente del AE, qué modelo utiliza *in vitro* o animal (detallando línea celular). Uso del AE como terapia de reemplazo o coadyuvante, metodología para obtener aceite y para evaluar viabilidad celular, resultados principales vinculados con los objetivos para evaluar viabilidad celular y resultados secundarios no vinculados.

#### **4.5 Análisis de resultados**

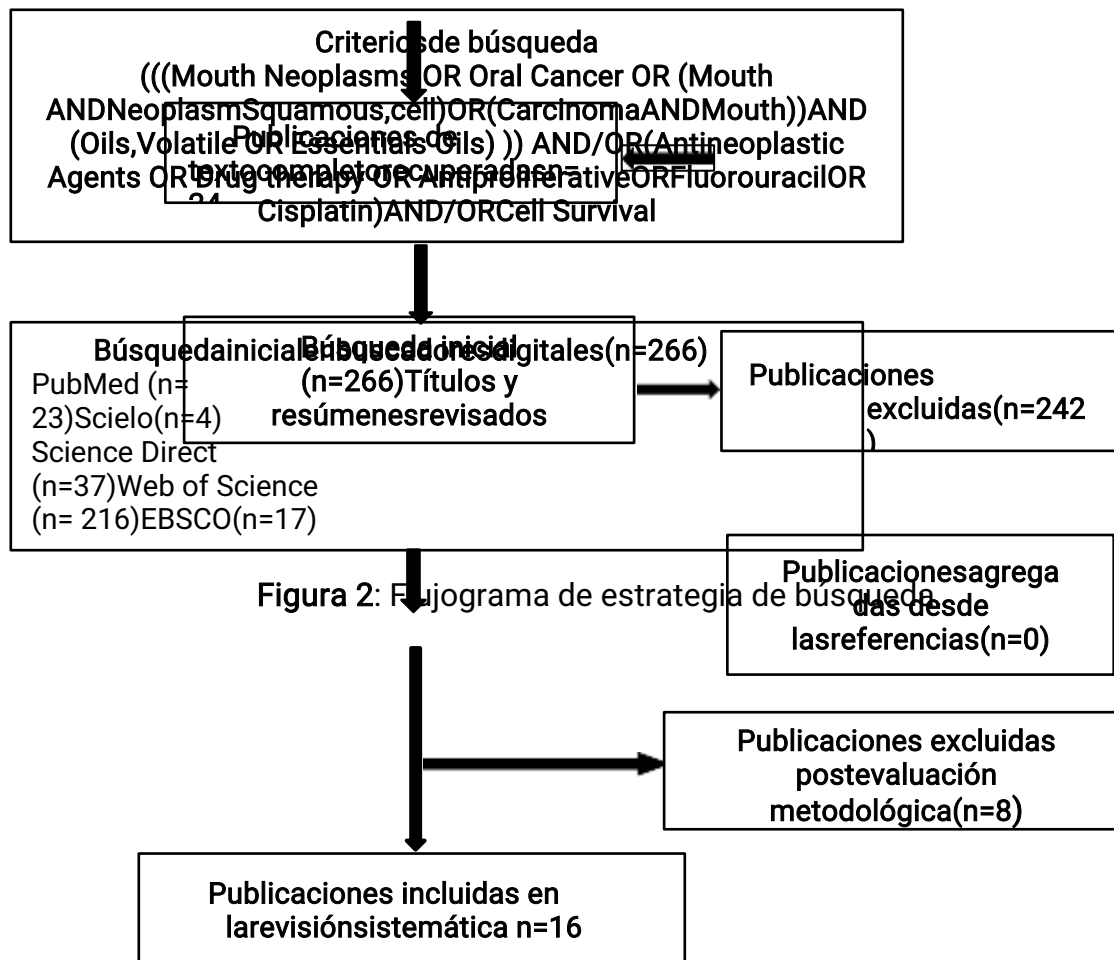
Se utilizó un flujograma, para esquematizar la búsqueda y selección de estudios. Tablas de evidencia que contienen autor, planta de donde proviene el AE, componente del AE, modelos del estudio, uso del aceite esencial como reemplazo o coadyuvante y resultados principales; diferenciando si se utilizó o no un quimioterapéutico como control positivo el cual produce efecto citotóxico sobre las líneas celulares para cáncer oral. Detalle de metodología ocupada para obtener el aceite y para evaluar viabilidad celular, junto con resultados secundarios.

### **5.RESULTADOS**

#### **5.1 Búsqueda , extracción y selección de estudios**

La búsqueda inicial de los buscadores digitales, identificaron: 266 artículos potenciales: En PubMed, Science Direct, EBSCO, ISI Web of Science y Scielo. De

estos fueron excluidos 242 luego de una selección por título y resumen. Después de revisar el documento completo de 24 publicaciones, 8 fueron excluidos por no cumplir con el estándar mínimo en la evaluación metodológica (Tablas 2 y 3). No se agregaron artículos a partir de la bibliografía, al no ser atingente con el tema de estudio o por ya estar incluidos. Quedaron un total de 16 incluidos en la revisión sistemática (Figura 2). Solo se encontraron estudios *in vitro*, estos fueron publicados entre los años 2006 y 2020.



**Tabla 2:** Evaluación metodológica. Lista de verificación adaptada CONSORT 2010 para incluir al informar un estudio *in vitro* (Moher et al., 2010).

Sección / Tema	Elemento de lista de verificación	
Título y resumen	Identificación como un estudio <i>in vitro</i> .	ID*
	Resumen estructurado del estudio, métodos, resultados y conclusiones.	RE*
Trasfondo y objetivos	Antecedentes científicos y explicación de la justificación.	AN*
	Objetivos específicos o hipótesis	OB*
Metodología (materiales y métodos)	Descripción de materiales y métodos a utilizar.	DM*
	Detalle de obtención y cultivo de líneas celulares.	DC*
	Las intervenciones para cada línea celular, detalles suficientes para permitir la replicación, incluido cómo, cuanto y cuándo se administraron realmente	IN*
	Cambios importantes en los métodos después del comienzo con razones	CA*
Resultados	Medidas de resultado de cada intervención incluyendo cómo y cuándo fueron evaluadas	MR*
	Métodos para análisis adicionales	MA*
	Narración de los resultados o utilización de tablas, esquemas, gráficos para mostrar los resultados de los eventos a estudiar	PR*
Discusión	Limitaciones del estudio, abordando fuentes de sesgo potencial, imprecisión.	LI*
	Interpretación consistente con resultados, balance de beneficios y daños, y considerando otra evidencia relevante	IT*

\* Abreviatura de elemento de la lista de verificación CONSORT modificada

**Tabla 3:** Evaluación metodológica de estudios seleccionados para evaluación más detallada según tabla 2.

Autor	Elemento de verificación de lista CONSORT modificada													
	ID	RE	AN	OB	DM	DC	IN	CA	MR	MA	PR	LI	IT	*
(Manosroi y cols., 2006)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Cha, Moon, y cols., 2009)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Cha, Jeong, y cols., 2009)	+	+	+	+	+	+	+	N/A	+	+	+	+	+	S/I
(Sertel y cols, 2011a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Sertel y cols, 2011b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Jo y cols., 2012)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Cha y Kim, 2012)	+	+	+	+	+	+	+	N/A	+	+	+	+	+	S/I
(Sanseera y cols., 2012)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Keawsa-ard, y cols., 2012)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Su y cols, 2012)	+	+	+	+	-	+	-	+	+	N/A	+	+	-	N/I
(Su y Ho, 2013)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	N/A	+	-	-	N/I
(Su y cols, 2013)	+	+	-	+	+	+	-	N/A	+	N/A	-	+	-	N/I
(Yang y cols., 2015)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Chang y cols, 2016)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Su & Ho, 2016)	+	+	-	+	+	+	-	N/A	+	+	-	+	-	N/I
(Su & Ho, 2017)														
(Fekrazad y cols., 2017)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Skalicka y cols., 2017)	+	+	-	+	+	+	-	N/A	+	+	-	+	-	N/I
(Su y cols, 2018)	+	+	-	+	+	+	-	N/A	+	+	-	+	-	N/I
(Tubtimsri y cols., 2018)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Antony y Geetha, 2019)	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	N/I
(Thakur y cols., 2019)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Costa y cols., 2020)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I
(Nirmala y cols., 2020)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S/I

\*Ver significado de abreviatura en tabla: **ID**=Identificación in vitro; **R**= Resumen estructurado; **AN**=Antecedentes científicos; **OB**=Objetivos; **DM**=Detalle material y métodos; **DC**=Detalle celular; **IN**=Intervención; **CA**=Cambios en métodos; **MR**=Medida de resultados; **MA**=Material adicional; **PR**=Presentación resultados; **LI**=Limitaciones; **IT**= Interpretación.

\* + : cumple con elemento; - : no cumple con criterio; **N/A**= No aplica.

\***N/I** =No incluido en revisión sistemática, por no cumplir con estándar ; **S/I**= Incluido en revisión sistemática, al cumplir con todos los criterios de evaluación

## 5.2 Análisis de los estudios incluidos

5.2.1 En las Tablas 5 y 6 se presentan el resumen de 6 estudios *in vitro* incluidos en la revisión sistemática cualitativa que utilizaron aceites esenciales con quimioterapéuticos (QTP) como control positivo, detallando autor y año, plantas de donde fueron obtenidos los aceites esenciales a utilizar, principal componente del AE, uso del aceite esencial como reemplazo o coadyuvante, línea celular de cáncer oral utilizada (Tabla 5), concentración y tiempo de exposición al aceite esencial, QTP y resultados principales (Tabla 6).

**Tabla 5:** Reporte de datos obtenidos de estudios incluidos según criterios de tabla 2 que poseen control positivo.

Autor (Referencia)	Planta del AE <sup>''</sup>	Principal componente	Tipo de uso del AE*	Línea Celular
(Costa y cols., 2020)	<i>Guatteria megalophylla</i> Diels	espatulenol (27,76%)	Reemplazo	CAL 27* HSC-3*
(Thakur y cols., 2019)	<i>Crassocephalum crepidioides</i> (Espinaca de Okinawa)	β-mirceno (65,9%)	Reemplazo	KB*
(Tubtimsri y cols., 2018)	<i>Mentha spicata</i> (Menta verde)	Carvona (70%)	Reemplazo	KON*
(Fekrazad y cols., 2017)	<i>Thymus Caramanicus</i> Jalas (Tomillo)	carvacrol (51%)	Reemplazo - Coadyuvante	KB
(Keawsa-ard, y cols., 2012)	<i>Solanum spirale</i>	(E)-fitol (48,1%)	Reemplazo	KB
(Manosroi y cols., 2006)	<i>O. sanctum L</i> (Albahaca santa)	No reportado	Reemplazo	KB
	<i>C. citratus</i> (Hierba de limón)	No reportado	Reemplazo	KB
	<i>Alpinia officinarum</i> (Galanga menor)	No reportado	Reemplazo	KB
	<i>Lavendula angustifolia P.</i> (Lavanda)	No reportado	Reemplazo	KB
	<i>Vetiveria zizanioides</i> (Vetiver)	No reportado	Reemplazo	KB
	<i>Zingiber montanum</i> (Plai)	No reportado	Reemplazo	KB
	<i>Piper nigrum L.</i> (Pimienta negra)	No reportado	Reemplazo	KB



<i>Cymbopogon nardus</i> (L.) (Hierba citronela)	No reportado KB	Reemplazo	
<i>C. longa</i> L. (Cúrcuma)	No reportado	Reemplazo	KB
<i>O. basilicum</i> L. (Albahaca dulce)	No reportado	Reemplazo	KB
<i>C. hystrix</i> DC. (Lima Kaffir)	No reportado	Reemplazo	KB
<i>Piper betel</i> L. (Vid de betel)	No reportado	Reemplazo	KB
Albizzia lebbek (Nuez)	No reportado	Reemplazo	KB
<i>Ocimum americanum</i> L. (albahaca peluda)	No reportado	Reemplazo	KB
<i>Mentha spicata</i> L. (Menta Verde)	No reportado	Reemplazo	KB
<i>Psidium guajava</i> (Guayaba)	No reportado	Reemplazo	KB

**\*AE=Aceite esencial. \*KB; KON =Carcinoma de células escamosas del piso de la boca. \*HSC-3; CAL27= carcinoma de células escamosas de lengua humana.**

**Tabla 6: Reporte de datos obtenidos de estudios incluidos según criterios de tabla 2 que poseen control positivo.**

Autor (Referencia)	Concentración AE*	Tiempo exposición	QTP*	Resultados principales
(Costa y cols., 2020)	10 a 40 µg/mL	72hrs	Doxorrubicina (DOX) 5-Fluorouracilo (5-FU)	<i>Guatteria megalophylla</i> , disminuye viabilidad celular sobre CAL27 y HSC-3, IC <sub>50</sub> 7,58 µg/mL para células CAL27 y 14,90 µg/ml para células HSC-3. Ambos quimioterapéuticos poseen un IC <sub>50</sub> menor en comparación al AE. Sobre CAL27, DOX* posee un IC <sub>50</sub> de 1.09 µg/mL y para 5-FU* 2,56 µg/mL. Para HSC-3, IC <sub>50</sub> de 0,86 µg/mL DOX y 1,01 µg/mL de 5-FU.
(Thakur y cols., 2019)	10 a 100 µg / mL	48hrs	Vinblastina	El aceite esencial de <i>Crassocephalum crepidioides</i> disminuye viabilidad celular a 32% con 100 µg/mL. Teniendo un IC <sub>50</sub> de 70,4 µg/mL. Variación tiempo-dosis dependiente.

(Tubtimsri y cols., 2018)

5  $\mu$ L / mL con diferentes relaciones AE menta verde(SMO) y Aceite de coco virgen (VCO) 100 :0 a 0:100

24 hrs. 5-Fluorouracilo nanoemulsión del AE de

La SMO-VCO (80:20) de mostrotenerrefectocitotóxicocntralascélulas di

s  
m  
i  
n  
u  
y  
e  
n

d  
o  
l  
a  
v  
i  
a  
b

i  
l  
i  
d  
a  
d

(Fekrazad cols., 2017)	y	0,05 a 1 $\mu$ L/ mL	24 hrs.	Doxorrubicina	<p>Demostó que el aceite esencial con 1<math>\mu</math>L/mL indujo toxicidad celular (viabilidad celular aprox. de 8 %).</p> <p>Thymus caramanicus (0,05 <math>\mu</math>L/mL) potencia el efecto de la doxorrubicina (concentración sub-efectiva de 2 y 3 <math>\mu</math>L/mL) en las células KB. IC<sub>50</sub> 0,44 <math>\mu</math>L / mL.</p>
(Keawsa-ard, y cols., 2012)		5 $\mu$ L/ml	72 hrs.	Doxorrubicina Elipticina	El aceite esencial posee efecto citotóxico sobre la línea de cáncer oral KB teniendo un valor de IC <sub>50</sub> de 26,42. $\mu$ L/mL
(Manosroi cols., 2006)	y	0,019-4,962 mg/mL	24 hrs.	Vincristina 5-Fluorouracilo	<p>El aceite de hoja de guayaba, la albahaca peluda y el vetiver mostraron un efecto citotóxico de 4,37, 3,92 y 2,45 veces más potente que la vincristina, respectivamente en células para cáncer oral. A continuación, se detallará los IC<sub>50</sub> y porcentaje de viabilidad de los 16 aceites esenciales utilizados: Hoja de guayaba 0,0379 mg/mL y 30%; Albahaca peluda 0,0424 mg/L y 30%; Menta verde 0,0647 mg/mL y 30%; Vetiver 0,0676 mg/mL y 25%; Citronela 0,0814 mg/mL y 24%; Plai 0,0944 mg/mL y 35%; Albahaca santa 0,0951 mg/mL y 24%; Lima kaffir 0,0997 mg/mL y 30%; Hierba de limón 0,1154 mg/mL y 24%; Pimiento negro 0,215 mg/mL y 21%; Albahaca dulce 0,3033 mg/mL y 30%; Lavanda 0,4453 mg/mL y 30%; Galanga menor 0,7222 mg/mL y 40%; Cúrcuma 1,0879 mg/mL y 52%; Vid betel y nuez, no fueron obtenidos. El IC<sub>50</sub> de vincristina (0,166 mg/mL) y 5-fluorouracilo</p>

(1,77 mg/mL) , nos demuestra que la mayoría de los aceites son más potentes que los quimioterapéuticos utilizados.

**\*AE= Aceite esencial; QTP= Quimioterapéutico; IC<sub>50</sub>=Concentración inhibitoria 50. Definida como "Concentración de un compuesto necesaria para reducir in vitro el crecimiento poblacional de organismos, incluidas las células eucariotas, en un 50 por ciento. Aunque a menudo se expresa para denotar la actividad antibacteriana in vitro, se utiliza también como un patrón de citotoxicidad a las células eucariotas en cultivo"(DECs);DOX= Doxorubicina; 5-FU=Fluorouracilo.**

5.2.2 En las Tablas 7 y 8 se presentan el resumen de 10 estudios *in vitro* incluidos en la revisión sistemática cualitativa que utilizaron aceites esenciales sin quimioterapéuticos como control positivo, detallando autor y año, plantas de donde fueron obtenidos los aceites esenciales a utilizar, principal componente del AE, uso del aceite esencial como reemplazo o coadyuvante, línea celular de cáncer oral utilizada (Tabla 7), concentración y tiempo de exposición al aceite esencial, quimioterapéutico y resultados principales (Tabla 8).

**Tabla 7:** Reporte de datos obtenidos de estudios incluidos según criterios de tabla 2 sin control positivo.

<b>Autor (Referencia)</b>	<b>Planta del AE</b>	<b>Principal Componente</b>	<b>Tipo de uso</b>	<b>Línea celular</b>
(Nirmala y cols.,2020)	<i>Cuminum cyminum</i>	Cumaldehido 32,5%	Reemplazo	SAS*
(Chang y cols., 2016)	<i>Cinnamomum Cassia</i>	trans- cinamaldehído	Reemplazo	HSC-3 *
(Yang y cols., 2015)	<i>Cinnamon cassia spp</i>	trans- cinamaldehíd o 87%	Reemplazo	SCC-25*
(Jo y cols., 2012)	<i>Pinus Densiflora</i>		Reemplazo	YD-8*
(Cha y kim, 2012)	<i>Cryptomeria Japonica</i>	Elemol 11,2%	Reemplazo	KB*
(Sanseera y cols., 2012)	<i>Cleidion javanicum</i>	Linoleolato de etilo 32%	Reemplazo	KB
(Sertel y cols., 2011a)	<i>Levisticum officinale</i>	Acetato α-terpinilo 48%	Reemplazo	UMSCC1*
(Sertel y cols., 2011b)	<i>Thymus Vulgaris</i>	Timol 33%	Reemplazo	UMSCC1
(Cha, Moon, y cols, 2009)	<i>Artemisia Capillaris</i>	Capileno 32,7%	Reemplazo	KB
(Cha y cols, 2009)	<i>Artemisia Iwayomogi</i>	Alcanfor 19,3%	Reemplazo	KB

**\* SAS; SCC-25; HSC-3; YD-8= Línea celular de Carcinoma de células escamosas de la lengua \*KB; UMSCC1= Carcinoma de células escamosas del piso de la boca**

**Tabla 8:** Reporte de datos obtenidos de estudios incluidos según criterios de tabla 2 sin control positivo.

<b>Autor (Referencia)</b>	<b>Concentración AE*</b>	<b>Tiempo de exposición</b>	<b>Resultados principales</b>
(Nirmala y cols.,2020)	0,4 a 2 µL/ mL	48 hrs.	La nanoemulsión de <i>Cuminum cyminum</i> afecta proliferación y viabilidad en célula de cáncer oral. La viabilidad celular disminuyó con 2µL/ mL a 25%. El de la nanoemulsión es IC <sub>50</sub> * 1,5 µL/ mL.
(Chang y cols., 2016)	2,5-40 µg / mL	24 hrs. 48 hrs.	<i>Cinnamomum Cassia</i> , disminuyó significativamente la viabilidad celular tiempo y dosis dependiente. 40 µg/ mL de aceite esencial a las 24 hrs. mostró una viabilidad de 40 %, disminuyendo a 20 % post- 48hrs. El IC <sub>50</sub> 13,7 µg/mL.
(Yang y cols., 2015)	6,25 a 100 µL/mL	24 hrs.	El uso de aceite esencial de <i>Cinnamomum Cassia</i> 100 µL/mL redujo la viabilidad celular casi al 100% (99,34%). Efecto dosis dependiente.
(Jo y cols., 2012)	20 a 60 µg / mL	8 hr.	<i>Pinus Densiflora</i> , afectó la proliferación y viabilidad celular, el tratamiento con 60 µg/mL tuvo mayor efecto inhibitorio; disminuyendo la proliferación en un 60% y la viabilidad celular a 30%.
(Cha y kim, 2012)	0,1 a 0,8 mg /ml	3/6/12/24/48 hrs.	El aceite esencial de <i>Cryptomeria Japonica</i> disminuyó la proliferación, a partir de 0,2 mg/mL se puede observar cambios, teniendo 0,8 mg/mL el mayor efecto en la viabilidad celular a las 24hrs. Respuesta dosis y tiempo dependiente, mayor efecto en 24 y 48 hrs. Tiene una viabilidad celular del 10%.
(Sanseera y cols., 2012)	12,5 a 62,5 µg/mL	72 hrs.	El aceite de <i>Cleidion javanicum</i> mostró actividad anticancerígena en células KB con un IC <sub>50</sub> de 47,16 µg/mL.
(Sertel y cols., 2011a)	0,54 µg/mL a 18 mg/mL	72 hrs.	Las concentraciones subtóxicas de aceite esencial de estimularon la proliferación y la viabilidad. Mientras que a mayor concentración disminuyó la viabilidad celular a 4,7% con 0,54 mg /mL. El IC <sub>50</sub> es 292,6 µg/mL
(Sertel y cols., 2011b)	0,54 µg/mL a 18 mg/mL	72 hrs.	El aceite esencial de tomillo estimulaba la proliferación y la viabilidad concentraciones subtóxicas y mientras más altas los efectos citotóxicos aumentan, dependientes de la dosis Hay una disminución rápida de la viabilidad celular a 1,3% con 540 µg/mL. El IC <sub>50</sub> calculado fue de 369,55 µg / mL.



(Cha, Moon, y cols., 2009)	0,1 a 0,7 $\mu\text{L}/\text{mL}$	6/12/18/24 hrs.	El aceite esencial de artemisa afecta la viabilidad celular, con 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de 20%, mientras que con 0,7 $\mu\text{L}/\text{mL}$ fue de 10% la viabilidad celular a las 24 hrs. Al evaluar la variable tiempo con 0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ el mayor efecto se determinó a las 24hrs, por tanto, tiene una respuesta dosis y tiempo dependiente ante células cancerígenas.
(Cha y cols, 2009)	50 a 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$	6/12/18/24 hrs.	El aceite esencial afecta la viabilidad celular en células de cáncer oral; 500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ disminuyó la viabilidad celular a 40% a las 12 hrs. mientras que esta misma concentración estudiada a diferentes tiempos, tuvo su mayor efecto a las 24 hrs. (viabilidad celular aprox. 10 %). Respuesta de aceite es dosis y tiempo dependiente.

**\*AE=Aceite esencial ; IC<sub>50</sub>=Concentración inhibitoria 50**

**5.2.3** Resumen de los 16 estudios *in vitro* incluidos en la revisión sistemática cualitativa, detallando la metodología utilizada para la extracción del aceite y método para determinar efecto sobre la viabilidad celular en las diferentes líneas de cáncer oral utilizadas, además se muestran resultados secundarios (Tabla 9).

**Tabla 9:** Reporte de metodología y resultados secundarios de todos los estudios incluidos.

<b>Autor (Referencia)</b>	<b>Metodología para obtención del AE</b>	<b>Metodología para viabilidad</b>	<b>Resultados Secundarios</b>
(Costa y cols., 2020)	Arrastre de vapor	Ensayo reducción de resazurina	El aceite esencial (AE) aumenta el porcentaje de células apoptóticas tempranas en HL-60 (leucemia), existiendo contracción celular y condensación nuclear. El AE no indujo un aumento significativo en los niveles de ROS.
(Nirmala y cols., 2020)	Comercial	Ensayo MTT	La nanoemulsión demostró apoptosis temprana en la línea celular SAS. Exhibió actividad antibacteriana significativa contra <i>Staphylococcus aureus</i> junto con la liberación de contenido citoplasmático.
(Thakur y cols., 2019)	Arrastre de vapor.	Ensayo MTT	El aceite esencial de <i>Crassocephalum crepidioides</i> obtenido se probó además del carcinoma oral contra el cáncer cervical humano SiHa y las líneas celulares de adenocarcinoma humano Colo-205 a las 48hrs lo que mostró efectos citotóxicos contra todas las líneas celulares, siendo $59,8 \pm 3,7\%$ y $84,5 \pm$

			3,6%, respectivamente.
(Tubtimsri y cols., 2018)	Comercial	Ensayo MTT	Las nanoemulsiones que contienen derivados del aceite de ricino de polioxi-etileno (PCO40) demostraron mayor transparencia y mejor estabilidad física. Además, la composición de los aceites tuvo un impacto en el tamaño de las emulsiones. La relación óptima del aceite esencial de menta verde, el tensioactivo y la composición de los aceites fueron factores críticos para la formación de nanoemulsiones.
(Fekrazad y cols., 2017)	Arrastre de vapor	Ensayo de MTT de ojo neutro	Los datos mostraron que el aceite extractado de <i>Thymus caramanicus</i> con un $IC_{50} = 105 \mu\text{g}/\text{mL}$ induce potentes propiedades citotóxicas. Además, el extracto de <i>Thymus caramanicus</i> podría potenciar el efecto del doxorubicina en concentraciones sub-efectivas.
(Chang y cols., 2016)	Comercial	Ensayo de MTT	El aceite esencial de Cinnamomum trans-cinamaldehído indujeron la detención del ciclo celular G2/M en células HSC-3, así como escalado de ADN y condensación de cromatina (características de apoptosis). Generaron disfunción mitocondrial y activaron la liberación de citocromo C y producción de ROS.
(Yang y cols., 2015)	Arrastre de vapor	Ensayo de MTT	El aceite esencial redujo la carga tumoral al 43,5% en el modelo de xenoinjerto de células Hep-2 junto con una inhibición del 89% de la actividad EGFR-TK, atribuyendo la acción anticancerígena a la supresión de esta.
(Jo y cols., 2012)	Comercial	Ensayo de MTT de exclusión de azul de tripan.	El aceite esencial es proapoptótico en células YD-8, produciendo la generación de ROS, activación de caspasa-9, escisión de PARP, regulación por inhibición de Bcl-2, fosforilación de ERK-1/2 y JNK-1/2. Por tanto, los efectos se deben en gran medida a la activación de caspasas dependiente de ROS.
(Cha y Kim, 2012)	Comercial	Ensayo MTT	Existió separación de células, cambio de forma a más redondeadas y contracción de las células a las mismas concentraciones del aceite esencial, junto con fragmentación del ADN.
(Sanseera y cols., 2012)	Destilación de vapor	Ensayo de actividad de azurina	El aceite mostró actividad anticancerígena contra el cáncer de mama MCF7 y el cáncer de pulmón de células pequeñas NCI-H187. Actividad antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Actividad antioxidante significativa.



(Keawsard, y cols., 2012)	Arrastre de vapor	Ensayo reducción de resazurina	El aceite esencial de <i>S. spirale</i> exhibió una actividad antioxidante débil con un IC <sub>50</sub> de 41,89 mg/mL. Actividad citotóxica ante MCF-7 (cáncer de mama) y NCI-H187 (cáncer de pulmón de células pequeñas) con un IC <sub>50</sub> 19,69 y 24,02 µg / mL, respectivamente. Además, se descubrió que posee actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> gram negativa y <i>S. aureus</i> gram positiva con inhibición.
(Sertel y cols, 2011a)	Destilación a vapor.	Ensayo de XTT	El aceite esencial de <i>Levisticum officinale</i> inhibe el crecimiento de células HNSCC humanas. Las tres vías que se regularon de manera más significativa fueron la señalización de la quinasa 5 regulada por señal extracelular (ERK5), la señalización de la quinasa unida a integrina (ILK), la entrada de virus a través de vías endofíticas y la señalización de p53.
(Sertel y cols, 2011b)	Destilación a vapor.	Ensayo de XTT	Después del tratamiento con el IC <sub>50</sub> , las rutas más reguladas de manera significativa por el aceite esencial de tomillo fueron, la señalización de interferón, la biosíntesis de N-glucano y la señalización ERK5.
(Cha, y cols., 2009)	Comercial	Ensayo MTT	El aceite esencial indujo la muerte celular de las células KB a través de la apoptosis, existiendo aumento de la población celular en la fase sub-G1, aparición de núcleos condensados y / o fragmentados. Causó cambios en el nivel mitocondrial de las proteínas de la familia Bcl-2 como Bcl-2 y Bax, lo que indujo la liberación de citocromo C. Sugieren la participación de las vías mediadas por p38 / NF-κB y JNK / Bcl-2.

(Cha y cols., 2009)	Comercial	Ensayo de MTT. Ensayo de exclusión de azul de tripán.	Mostraron que el aceite esencial induce la muerte apoptótica de las células KB, mediada por proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Además, no solo indujo un desequilibrio entre los niveles mitocondriales de Bcl-2 y Bax con la liberación concomitante de citocromo c en el citosol, sino que también indujo la activación de caspasas y la escisión de PARP.
(Manosroi y cols., 2006)	Destilación a vapor	Ensayo de MTT	Basado en el IC50 de 17 aceites esenciales, los dividieron en tres grupos según posibilidades de convertirse en agentes antineoplásicos:(1) aceites esenciales con valores de IC <sub>50</sub> menor a 0,125 mg/mL poseen mayor posibilidad;(2) aceites con valores de IC <sub>50</sub> entre 0,125 y 5 mg/mL con

posibilidad moderada;(3) aceites que tenía la IC<sub>50</sub> de más de 5 mg/mL ,baja posibilidad.

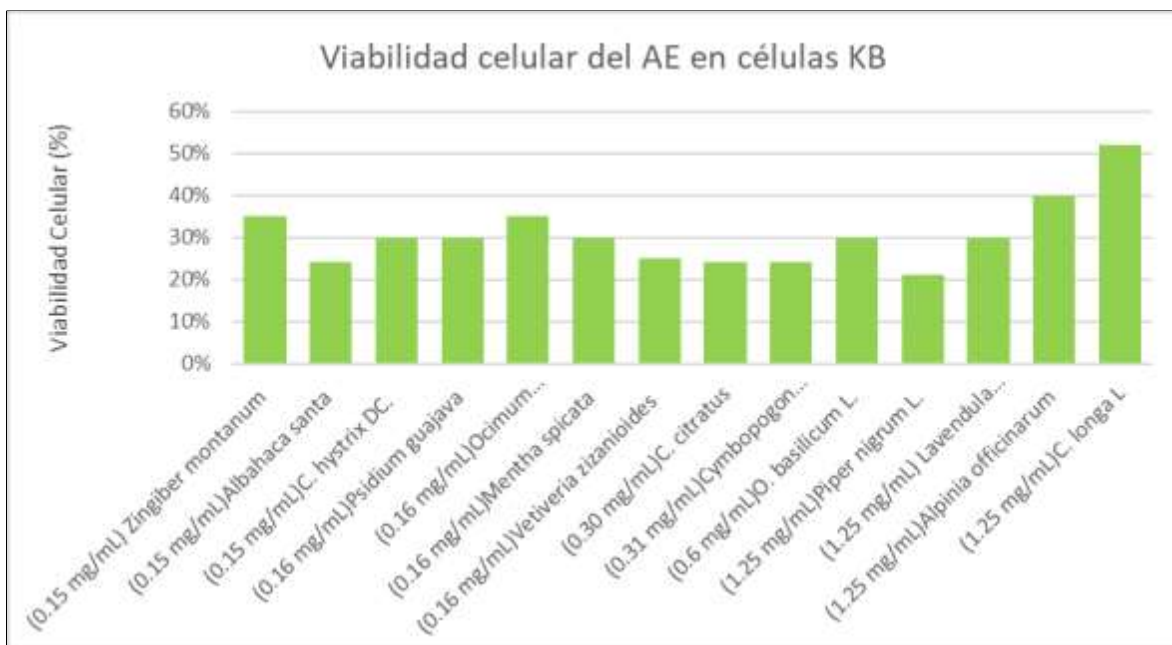
En la línea celular P388, el aceite de albahaca dulce, hoja de guayaba y albahaca peluda mostró un efecto citotóxico de 12,70; 15,93 y 18,17 veces menos potente que el 5-FU, respectivamente. El aceite de albahaca dulce tuvo la mayor actividad antiproliferativa en la línea celular P388, pero no en la línea celular KB.

*\*GC-MS= Cromatografía de gases-espectrometría de masas; MTT= Reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico; XTT= Reducción enzimática de la sal de tetrazolio*

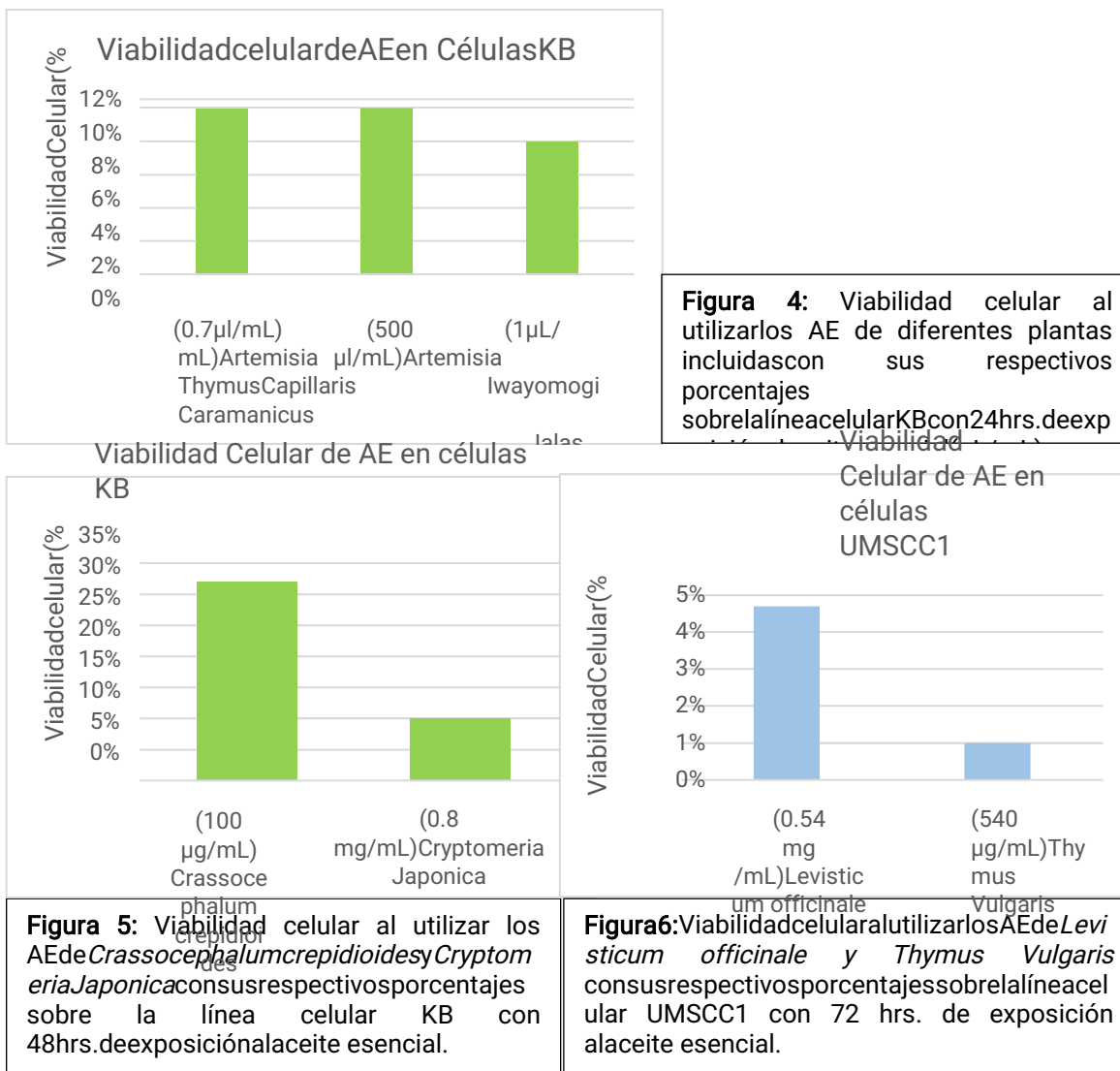
## 5.2.4 Recapitulación de estudios incluidos en la revisión sistemática cualitativa

Se realizaron gráficos los principales resultados de acuerdo con los objetivos principales de esta investigación. En primer lugar, en las Figuras 3, 4, 5 y 6 se muestra el efecto sobre la viabilidad celular de los distintos AE sobre las líneas celulares de cáncer oral KB y UMSCC. Estas se agruparon según tiempo de exposición (24, 48 y 72hrs), línea celular utilizada y unidad de medida de concentración del aceite esencial. También, podemos ver en la tabla 10 aquellas viabilidades que no pueden ser comparadas por ser AE de diferentes plantas, tener unidades de medida de tiempo de exposición, concentración y líneas celulares distintas entre ellas.

La figura 7 detalla la frecuencia de uso de los métodos utilizados por los autores para evaluar la viabilidad celular.

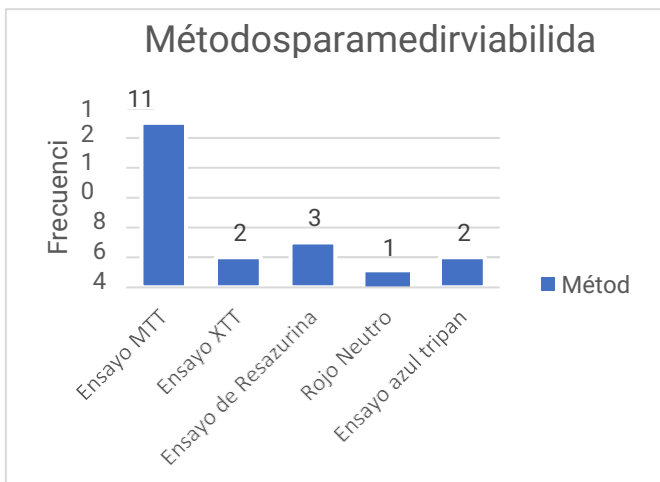


**Figura 3:** Viabilidad celular de las diferentes plantas incluidas con sus respectivos porcentajes sobre la línea celular KB con 24 hrs. de exposición al aceite esencial.



**Tabla 10:** Viabilidad Celular de 5 aceites esenciales de plantas distintas sobre diferentes líneas celulares.

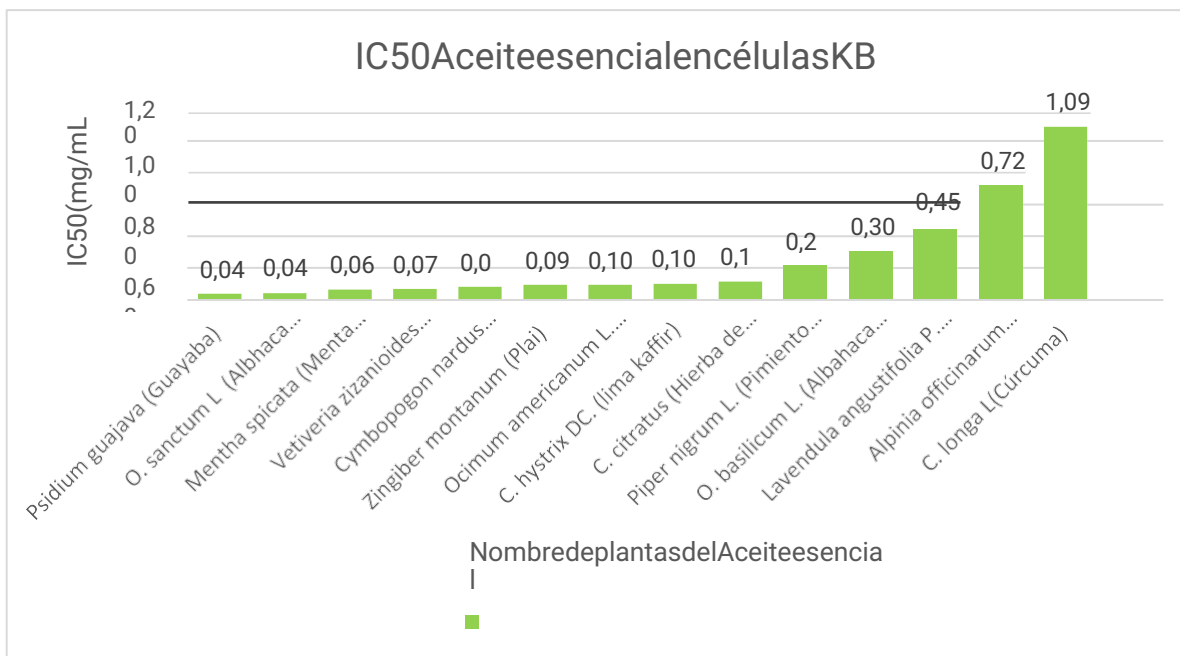
Nombre de planta del aceite esencial	Concentración del AE	Viabilidad Celular (%)	Tiempo de exposición (horas)	Línea Celular
<i>Pinus Densiflora</i>	60 μg/mL	30%	8	YD-8
<i>Cinnamon cassia spp</i>	100 μl/mL	0,7%	24	SCC-25
<i>Mentha spicata</i> (Nanoemulsión)	5 μL/mL	18%	24	KON
<i>Cuminum cyminum</i> (Nanoemulsión)	2 μL/mL	25%	48	SAS
<i>Cinnamomum Cassia</i>	40 μg/mL	20%	48	HSC-3



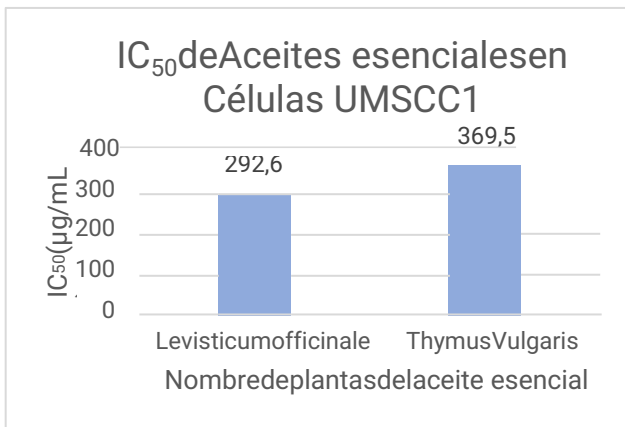
**Figura 7:** Frecuencia de los distintos métodos utilizados en los 16 estudios incluidos para la evaluación de la viabilidad celular.

En las figuras 8 y 9, se muestran las distintas concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>) de los aceites esenciales, obtenidos por los diferentes autores para las distintas líneas celulares utilizadas. Se agrupó según la unidad de medida usada, línea celular y tiempo de medición. Además, en la tabla 11 se resume aquellas IC<sub>50</sub> de distintas unidades de medidas de 8 aceites esenciales de distintas plantas en diferentes líneas celulares determinados en tiempos diferentes, que no pueden ser comparables. La figura 10 esquematiza el método de obtención del aceite esencial utilizado para las investigaciones incluidas.

La figura 11 detalla la evaluación del aceite esencial sobre las líneas de células cancerosas, si midieron su uso como nuevo tratamiento (reemplazo), potenciar un quimioterapéutico convencional (coadyuvante) o ambas anteriores.



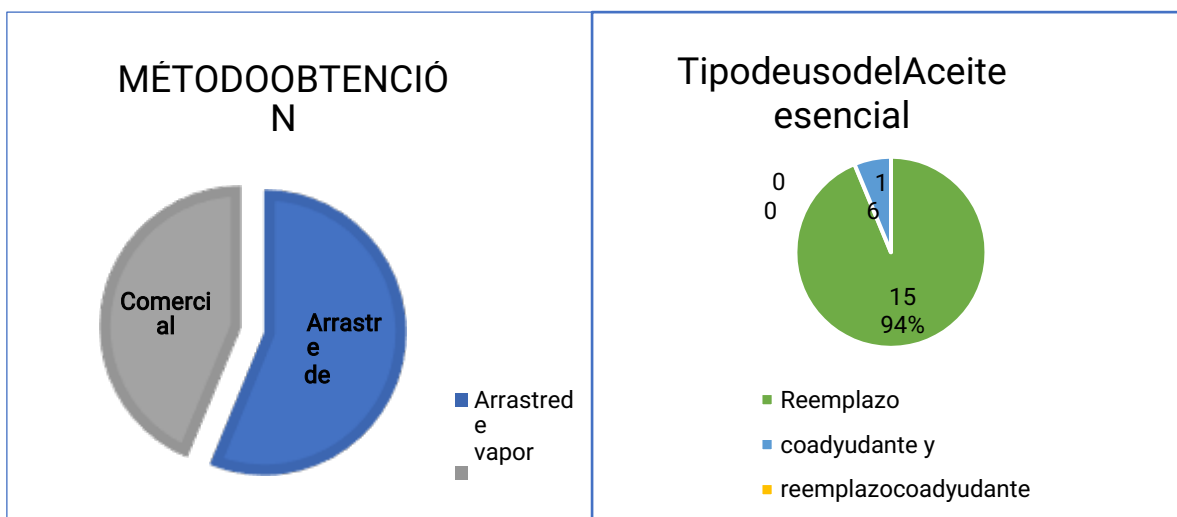
**Figura 8:** Concentración mínima inhibitoria en mg/mL de distintos tipos de aceites a las 24 hrs. esenciales sobre células KB.



**Figura 9:** Concentración mínima inhibitoria en µg/mL de distintos tipos de aceites esenciales sobre células UMSCC1 a las 72 hrs.

**Tabla 11:** Concentración mínima inhibitoria en distintas unidades de medidas (µL/mL o µg/mL) de 8 aceites esenciales de distintas plantas en diferentes líneas celulares (KB, SAS, CAL-27, HSC-3) determinados en tiempos diferentes.

Nombre planta del aceite esencial	IC <sub>50</sub> en µg/mL	Línea celular	Tiempo (hrs.)
<i>Guatteria megalophylla</i> Diels	14,9 µg/mL	HSC-3	72
Cinnamomum Cassia	13,7 µg/mL	HSC-3	48
Crassocephalum crepidioides	70,4 µg/mL	KB	48
<i>Cleidion javanicum</i>	47,16 µg/mL	KB	72
<i>Guatteria megalophylla</i> Diels	7,58 µg/mL	CAL-27	72
<i>Solanum Spirale</i>	26,42 µL/mL	KB	72
Thymus caramanicus jalas	0,44 µL/mL	KB	24
Cuminum cyminum	1,5 µL/mL	SAS	48



**Figura 10:** Método de obtención de los aceites esenciales utilizados, 44% fue obtenido de manera comercial y 56% por extraído por arrastre de vapor.

**Figura 11:** Frecuencia en el uso del aceite esencial como terapia de reemplazo, coadyuvante o ambos frente a líneas celulares de cáncer de los 16 estudios incluidos.

## 6. DISCUSIÓN

A pesar de conocer las propiedades de diferentes tipos de plantas desde la antigüedad y su uso como base para distintos tipos de fármacos, muchos de estos fármacos presentan una creciente resistencia, por esto, se ha reactivado el uso de plantas y se ha impulsado su estudio con el fin de poder ser utilizados como alternativa de tratamiento para diversas enfermedades (Aziz y cols., 2018; Valdivieso y cols., 2019). Efectivamente muchos tratamientos actuales presentan efectos secundarios, y como se explicó anteriormente, el cáncer oral no está ajeno a esta situación. En este escenario los aceites esenciales y sus componentes volátiles individuales han despertado el interés de grupos de investigación en el cáncer. Debido a lo anterior es que el presente estudio tuvo como objetivo establecer a través de la búsqueda sistemática de la literatura si existen diferencias en la viabilidad celular de células tumorales en un modelo *in vitro* o efecto antitumoral *in vivo* cuando se emplea el uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante comparado con la terapia tradicional en cáncer oral.

### 6.1 Métodos de obtención del Aceite esencial

Los aceites esenciales como tal son aquellos que se obtienen por método de destilación con agua o vapor, por un proceso mecánico, o por destilación seca, ya que estos serían puros. Dentro de la literatura se describen distintos métodos de extracción dentro de los cuales encontramos las convencionales como: Destilación por arrastre de vapor (DAV), a través de solventes, con extractor Soxhlet, entre otras y técnicas más nuevas de extracción de fluido supercrítico, hidrodestilación asistida por microondas, las cuales aumentan el rendimiento del material vegetal. El método de destilación al vapor es la técnica más ampliamente utilizada, a pesar de que requiere tiempos más largos versus otros métodos, nos brinda un AE más puro, el porcentaje de aceites esenciales que son extraído por esta técnica es del 93% y el 7% restante puede ser extraído por otros métodos. Esto se condice con los datos encontrados en la revisión sistemática, dado que el 56 % de los estudios, es decir, 9, prefirieron utilizar el método arrastre de vapor, versus 44% que obtuvieron el aceite esencial de manera comercial (Figura 10). Los AE que son fabricados a de manera industrial, también, son extraídos principalmente por DAV, solo que utilizan

equipos a mayor escala. El rendimiento en la extracción del AE, depende del tipo de especie y segmento utilizados de las plantas. Las diferencias entre las propiedades químicas, calidad y cantidad de los aceites esenciales como se nombró anteriormente no solo se altera según lugar geográfico, composición del suelo y etapa del ciclo vegetal sino también en sus estructuras estereoquímicas, que pueden ir variando según el método de extracción seleccionado, causando muchas veces la pérdida de componentes farmacológicos, cambio físico de los AE, cambios en el sabor u olor (Aziz y cols, 2018; Jing y cols., 2019; Linde y cols., 2016; Paredo y cols, 2009).

Las diferencias entre obtener o no el aceite esencial a través de su propio método de extracción por los diferentes autores, debe haberse determinado a partir del uso de plantas que comercialmente no están disponibles y potenciarlas por la comunidad científica, o poder determinar la acción exacta en la viabilidad celular de plantas en donde las variables externas sean controladas por los diferentes autores o tan solo por ser plantas recientemente estudiadas. Si pensamos que la búsqueda de nuevas alternativas quimioterapéuticas se base en el uso de aceites esenciales, es primordial que dichas especies tengan una alta disponibilidad y no sean sobreexplotadas, característica que nos da que sean fabricadas a mayor escala.

## **6.2 Actividad citotóxica de los aceites esenciales**

Aunque la investigación sobre la aplicación de AE como agentes antitumorales es relativamente nueva, cabe mencionar que la mitad de los quimioterapéuticos de uso frecuente proceden de plantas. Aproximadamente un 25% derivados directamente de plantas y un 25% son versiones modificadas químicamente de fitoproductos, un ejemplo de esto es el paclitaxel, derivado originalmente de la corteza del árbol *Taxus brevifoli* (Gautam, y cols, 2014; Pezzani y cols., 2019).

Las estrategias terapéuticas contra el cáncer están centradas en la inducción de la apoptosis o la detención del ciclo celular en las células tumorales; recordando que las características claves para existencia del cáncer es la resistencia a la muerte celular, señalización proliferativa sostenida y evitar a supresores del crecimiento. Varios estudios han demostrado que los aceites esenciales y sus diferentes



componentes poseen efectos citotóxicos en diversos modelos de células cancerosas a través de diferentes vías (Sharifi-Rad y cols., 2017). El carvacrol presente en los aceites esenciales de tomillo y orégano, suprime la proliferación de células cancerosas de cáncer oral Tca-8113 y SCC-25 (carcinoma de células escamosas de lengua) a través de varias vías biológicas que incluyen la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la adhesión y la invasión celular (Dai y cols 2016).

En la evaluación de los estudios incluidos se pudo evaluar la inhibición de la viabilidad celular de 26 plantas distintas sobre diferentes líneas celulares para cáncer oral entre ellas encontramos las células KB, KON, SAS, YD-8, HSC-3, SCC- 25 y UMSCC1. Si consideramos todas las plantas incluidas, el porcentaje de eficacia de inhibir la viabilidad celular detallado por los diferentes autores estuvieron entre el 48% y 99,3%. El porcentaje más bajo de inhibición en la viabilidad celular (48%) fue del aceite esencial de *C. Longa. L* (cúrcuma) sobre las células KB y el más alto por parte de *Cinnamomum Cassia con* 99,3% de inhibición de la viabilidad sobre SCC- 25 (Figuras 3-6 y tabla 10). El AE de *Cinnamomum Cassia*, sería un agente muy prometedor para cáncer oral, generando una citotoxicidad cercana al 100 %. La planta de *Cinnamomum cassia* y sus componentes han sido estudiados en cáncer de pulmón, de mama, cuello uterino y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. En el año 2018, se informó que los extractos etanólicos de esta planta puede inducir la muerte de las células cancerosas de la boca e inhibir el crecimiento tumoral de ratones desnudos activando la caspasa-3 y reduciendo la Bcl-2 para inducir la apoptosis (Zhang y cols., 2019).

Si comparamos la viabilidad celular de aquellos estudios que solo utilizaron células cancerosas KB y las expusieron durante 24 hrs. a distintas concentraciones de distintos aceites esenciales, nos da que 17 plantas presentan actividad citotóxica afectando en distintos porcentajes la viabilidad. El que tuvo una mayor eficacia fue *Thymus jalas con* 92 % de inhibición de viabilidad (Figura 4), cuyos principales componentes son carvacrol y timol. En el 2018, De La Chapa y cols, reportaron que el timol tiene efectos antiproliferativos en múltiples tipos de células cancerosas,

entre ellas para las células HL-60 (leucemia mieloide aguda) y para células cáncer oral en Cal-27, SCC-4 y SCC-9, con efecto citotóxico de aproximadamente 99 %, al inducir apoptosis y disfunción mitocondrial (De La Chapa y cols, 2018). Por otro lado, *C.Longa.L* (cúrcuma), fue el AE con menor eficacia de inhibición de viabilidad sobre la línea KB (Figura 3), como aceite esencial no ha sido estudiado mucho. Los estudios se han centrado en la curcumina, un polifenol de esta planta, que se utiliza como fármaco antitumoral, teniendo efectos favorables en cáncer colorrectal, melanoma, gástrico, mama, fibrosarcoma óseo y en cáncer de cabeza y cuello, estudios *in vitro* mostraron que la curcumina induce apoptosis celular, a través de mecanismos directos e indirectos (Araújo y Leon, 2001; Giordano y Tommonaro, 2019).

También se pudo observar que el AE de *Artemisia Capillaris e Iwayomogi*, presentan la misma inhibición en la viabilidad celular (90%) frente a la línea celular KB tras el mismo tiempo de exposición (24 hrs.), pero con diferentes concentraciones; a pesar de pertenecer al mismo género, *Artemisia Capillaris* tiene ese porcentaje con una concentración considerablemente menor de 0,7 $\mu$ L/mL versus 500  $\mu$ L/mL del aceite de *Artemisia Iwayomogi*, lo que nos habla del potencial citotóxico de *Capillaris* (Figura 4). Existe evidencia considerable que muestra que los compuestos activos en los aceites esenciales de diferentes especies de *Artemisia* son responsables de su efecto antiproliferativo al inducir apoptosis en células cancerosas, entre ellas cáncer de colon y mama (Abad y cols., 2012; Tilaoui y cols., 2015). Es necesario resaltar que las distintas especies de plantas presentan una variación en los componentes volátiles de sus aceites esenciales, los que son influenciados por el crecimiento en distintas ubicaciones geográficas, pH del suelo, condiciones de secado, uso de fertilizantes, parte de la planta o el método de extracción (Jing y cols., 2019; Linde y cols., 2016).

Cabe destacar que los efectos de los aceites esenciales sobre las diferentes líneas celulares son dosis y tiempo dependientes, por ejemplo Cha, Moon, y cols ( 2009) al evaluar el AE de *artemisia* a una concentración de 0,5  $\mu$ L/mL la inhibición de la viabilidad celular fue de 80% mientras que con 0,7 $\mu$ L/mL fue de 90% a las 24 hrs. Luego tras evaluar la variable tiempo a las 6;12;18 y 24 hrs. con 0,5  $\mu$ L/mL de AE,

el mayor efecto se determinó a las 24 hrs, por tanto, tiene una respuesta dosis y tiempo dependiente ante células tumorales (Tabla 7 y 8). Así mismo, Spyridopoulou y cols, lo observó al estudiar la actividad citotóxica del aceite esencial de orégano (*Origanum onites*) ante líneas para cáncer de melanoma, colon, hepático y mama (Spyridopoulou y cols., 2019).

La inhibición de viabilidad celular de los AE de *Crassocephalum crepidioides* y *Cryptomeria Japonica* sobre la línea celular KB con 48 hrs. de exposición al aceite esencial es de 69% y 90% respectivamente (Figura 5). La concentración del aceite esencial de *Cryptomeria Japonica* fue 8 veces más que la concentración de *Crassocephalum crepidioides* que solo utilizó 100 µg/mL, quizás al aumentar su concentración pudo haber obtenido resultados en la inhibición similares a *Cryptomeria*. *Crassocephalum crepidioides*, su actividad anticancerígena solo ha sido estudiada en los estudios incluidos en esta revisión al igual que *Cryptomeria Japonica*. Mientras que Matsunaga y cols han reportado que el aceite esencial de *Cryptomeria Japonica* muestra actividad antiulcerosa y disminuye significativamente las lesiones gástricas, hallando como compuestos principales Terpinen-4-ol y Elemol (De Assis Oliveira y cols.,2014). Bahar y cols (2017) mostraron que *C. crepidioides* tiene actividades antidiabéticas en un cultivo de células β pancreáticas.

En la línea celular UMSCC1 solo dos plantas con sus aceites esenciales evaluaron su efecto tras 72 hrs. de exposición. *Levisticum officinale* y *Thymus Vulgaris* (Figura 6), obtuvieron un 95,3 % y 99% respectivamente de inhibición de la viabilidad celular, siendo dos candidatos prometedores por su actividad anticancerígena para cáncer oral. Estos aceites esenciales ya han sido probados en otros tipos de cáncer y también han obtenido grandes resultados. Por ejemplo, el AE de *Thymus vulgaris*, hierba medicinal china cuyo principal componente es el timol, en estudios sobre el cáncer de mama, próstata y pulmón se ha reportado una viabilidad celular que varía desde el 4% hasta el 1%. Además, el solo uso de timol mostró que *in vitro* inhibió la proliferación celular e indujo la apoptosis y detuvo el ciclo celular en cáncer colorrectal (Kubatka y cols., 2019; Zeng y cols., 2020). *Levisticum Officinale*, por su

parte, en cáncer ha sido estudiado el uso de extracto hidroalcohólico, generando apoptosis en varias líneas celulares de cáncer de mama alterando niveles del ARNm (disminuyendo gen *ZNF703*) y la vía de señalización cGMP, además tendría efecto sobre la leucemia (Mollashahee-Kohkan y cols., 2019; Sargazi, Saravani y Shahraki, 2019).

Se encontraron estudios que describieron que los aceites esenciales con dosis sub letales promueven la proliferación y viabilidad de células cancerosas y que al aumentar las dosis tienen un efecto citotóxico, un ejemplo es el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) el cual con 0,54 µg/mL estimuló la proliferación y la viabilidad de las células UMSCC1 y al aumentar la concentración a 540 µg/mL los efectos citotóxicos aumentan generando una disminución rápida de la viabilidad celular a 1,3% (Tabla 8). Otro ejemplo de ello, el Honokiol, pequeña molécula orgánica natural purificada de la corteza, conos de semillas y hojas de árboles de Magnolia en las células de cáncer oral con concentraciones subtóxicas, induce la proliferación de células cancerosas como mecanismo de protección ante estímulos perjudiciales, mientras que a concentraciones más altas, este mecanismo de defensa es anulado por los efectos citotóxicos (Ji y cols., 2017; Kubatka y cols., 2019; Sertel y cols., 2011b)).

Las propiedades biológicas de los aceites esenciales se pueden atribuir a su compleja composición con más de 300 compuestos volátiles diferentes. Estos compuestos volátiles incluyen terpenos, alcoholes, ácidos fenólicos, éteres, ésteres, aminas, entre otros. La mayoría de sus propiedades están relacionadas con sus componentes principales. Es importante destacar que todos los componentes ya sean en mayor o menor porcentaje generan un efecto sinérgico al efecto de los aceites esenciales (Pezzani y cols., 2019).

Solo un estudio incluido reportó el uso de aceite esencial como coadyuvante de la terapia convencional para CO, este fue el estudio de Fekrazad y cols (2017) quienes evaluaron el efecto de *Thymus caramanicus* al combinarlo con el quimioterapéutico doxorubicina, ellos utilizaron 0,05 µL/mL de AE más una concentración sub-efectiva del quimioterapéutico de 2 y 3 µL/mL contra células KB, determinando que el uso del AE potencia el efecto de la doxorubicina (Figura 11 y tabla 6). A pesar del

limitado número de estudio que investigó el efecto coadyuvante, la literatura apoya la existencia de efectos sinérgicos entre agentes quimioterapéuticos convencionales y plantas naturales, con el fin de mejorar propiedades de los fármacos, antagonizar la resistencia y disminuir efectos secundarios de éstos. El aceite esencial de *Nigella sativa* (*comino negro*), su componente Timoquinona y su asociación con doxorubicina en células HL60 (leucemia), 518A2 (melanoma), HT-29 (colon), KB-V1(cuello uterino) y MCF-7 (mama) mejoró las propiedades antineoplásicas de este fármaco al inhibir crecimiento de células cancerosas (Bhalla y cols., 2013; Valdivieso y cols., 2019). De manera similar, la timoquinona aumentó la citotoxicidad inducida por cisplatino y docetaxel en línea celular para cáncer de mama con p53 mutante y cáncer oral (Alaufi y cols., 2017; Pezzani y cols., 2019). El Honokiol en combinación con 5-fluorouracilo (5-FU) en las células de cáncer oral HSC-3 y HSC-4 tuvo un efecto sinérgico, aumentando significativamente la apoptosis. (Ji y cols., 2017).

Los antineoplásicos necesitan inhibir el 100% de la viabilidad de células cancerosas, por esto, podemos pensar que la mayoría de los AE estudiados para cáncer oral no podrían ser utilizados como reemplazo de la terapia convencional. A pesar de lo anterior, bajo el concepto de sinergia aquellos aceites esenciales que tuvieron porcentaje de inhibición menor y no tan cercano al 100%, por ejemplo, la cúrcuma, lavanda, pimienta negra, entre otros, se deberían considerar como posibles agentes antitumorales para cáncer oral, ya que, posiblemente su efecto citotóxico se potencie al combinarse con otros aceites esenciales o con un antineoplásico convencional. Por ejemplo, en un estudio se utilizaron los AE de Hinojo (*Foeniculum vulgare*) y clavo (*Syzygium aromaticum*), evaluando su actividad anticancerígena sobre células CACO -2 (adenocarcinoma intestinal) cada uno por sí solos y en combinación. El AE de hinojo, principalmente estaba compuesto por trans-anetol (68,3%) y el AE de clavo por eugenol (71,4%). Los autores mostraron que cada AE por si solo tuvo en efecto citotóxico, pero este aumentó al ser usado en combinación provocando la detención del ciclo celular y apoptosis, que puede ocurrir a través de efectos sinérgicos entre los ingredientes activos del aceite de clavo y el hinojo (El- Garawani y cols, 2019). Otro ejemplo, es el aceite esencial de *Curcuma zedoaria* y

paclitaxel, agente quimioterapéutico de primera línea que se usa para tratar a pacientes con cáncer de ovario. Se evaluó la viabilidad celular del AE por si solo y en conjunto a paclitaxel, el ensayo de viabilidad celular indicó que cualquiera de estos compuestos solos o en combinación suprimió el crecimiento de células de cáncer ovárico; en combinación existió una mayor inhibición de la proliferación e inducción de la apoptosis, por lo tanto, suplementar paclitaxel con aceite esencial de *Curcuma zedoaria* puede ser una estrategia de tratamiento eficaz para disminuir la dosis y la toxicidad de este quimioterapéutico (Zhou y cols. 2015).

Los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento, además, estos métodos también son comunes para la detección de la proliferación celular (Kumar, Nagarajan, y Uchil, 2018; Stepanenko y Dmitrenko, 2015). La metodología preferida por los 16 estudios incluidos para determinar la viabilidad celular de los diferentes aceites esenciales sobre las distintas líneas celulares de cáncer oral mostró que el método más utilizado fue el ensayo MTT, seguido por XTT y ensayo de resazurina (Figura 7). Los ensayos deben tener como principales características rapidez, sensibilidad, reproductibilidad, seguridad y que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar (Stepanenko y Dmitrenko, 2015). Si comparamos con la literatura, nos dice que los ensayos basados en la función metabólica de las células usando sales de tetrazolio (MTT o XTT) son unos de los métodos más usados en la investigación del cáncer para medir la proliferación celular, la viabilidad y la citotoxicidad de los fármacos, pero que requieren mucho tiempo como ensayos de exclusión de azul tripán o de titulación de timidina. Mosmann en 1983, desarrolló el ensayo MTT y determinó que la producción de MTT-formazán era proporcional al número de células metabólicamente viables. En las células vivas, el tinte amarillo, soluble en agua, se reduce a un precipitado de formazán de color cristal azul violeta insoluble al agua, que puede analizarse colorimétricamente después de disolverse en un disolvente orgánico (Stefanowicz y Ochocka, 2020; Kumar y cols., 2018; Stepanenko y Dmitrenko, 2015). La resazurina es un colorante que se reduce en dos pasos, en resorufina (rosado altamente fluorescente) y en dihidroresorufina,

compuesto incoloro y no fluorescente. Así, la medida de fluorescencia obtenida de la resazurina es un indicador de la función mitocondrial. Este ensayo es poco tóxico para las células ya que la resorufina se difunde al medio e inicialmente al no concentrarse al interior de la célula no induce muerte, como sí ocurre en otras técnicas (Escobar, Rivera y Aristizábal, 2008).

Es importante destacar que se ha encontrado que podría existir una subestimación o sobreestimación del ensayo MTT en el número de células viables en comparación con las mediciones de ATP. Por otra parte, la reducción de resazurina se ha descrito como un método variable según la línea celular evaluada. Para evitar una mala interpretación de los resultados, se recomienda la suplementación de los ensayos basados en la sal de tetrazolio con otros ensayos no metabólicos. Para elegir el ensayo de viabilidad óptimo, se deben considerar en detalle el tipo de célula, las condiciones de cultivo aplicadas y las preguntas específicas que se plantee (Escobar y Aristizábal, 2010; Stepanenko y Dmitrenko, 2015).

### **6.3 Concentración inhibitoria media de los Aceites Esenciales**

La concentración inhibitoria media, "*Concentración de un compuesto necesaria para producir la inhibición en un 50 por ciento de la viabilidad celular*" ( $IC_{50}$ ). Esta medición fue realizada en 24 aceites esenciales de los estudios incluidos sobre las distintas líneas celulares antes mencionadas. Esta característica, nos permite comparar la potencia de cada AE, así que, mientras más pequeño es el valor de  $IC_{50}$  tendrá mayor potencia como posible antineoplásico, sobre todo al comparar con un quimioterapéutico convencional.

De los 14 aceites esenciales en los cuales se determinó su  $IC_{50}$  en la línea celular KB a las 24 hrs. Entre ellos el que tuvo el menor valor fue el AE de hoja de guayaba, albahaca santa y menta verde. Los  $IC_{50}$  de 5-fluorouracilo y vincristina, sobre la línea celular KB del estudio de Manosroi y cols (2006), son 0,166 mg/mL de vincristina y 1,77 mg/mL de 5-fluorouracilo, mostrando que la mayoría de los AE son más potentes que los quimioterapéuticos utilizados. Por ejemplo: EL AE de la hoja de guayaba y albahaca santa tienen un  $IC_{50}$  de 0,06 mg/mL por lo que serían 4,15 y 44 veces más potente que vincristina y 5-fluorouracilo, respectivamente. Por otro lado, los

aceites esenciales de cúrcuma (1,09 mg/mL), galanga menor (0,72 mg/mL) y lavanda (0,45 mg/mL) tienen una potencia baja ( $IC_{50}$  de mayor valor), pero siguen siendo más potente que estos quimioterapéuticos convencionales (Figura 8). En comparación con valores encontrados en otros estudios del  $IC_{50}$  de 0,062 mg/mL de cisplatino sobre la línea celular KB, se igualaría a la potencia encontrada en aquellos AE con  $IC_{50}$  más bajos como la guayaba, albahaca santa y menta verde (Jaafari-Ashkvandi y cols., 2019).

Al comparar los valores de  $IC_{50}$  de los dos aceites esenciales sobre la línea UMSCC1 determinado a las 72 hrs, *Levisticum officinale* y *Thymus Vulgaris* (Figura 9). El AE de *Levisticum officinale* sería más potente en lograr la disminución del 50% celular con un  $IC_{50}$  de 292,6  $\mu$ g/mL versus 369,5  $\mu$ g/mL de *Thymus vulgaris*, caso opuesto al recordar lo que encontramos en términos de inhibición de viabilidad celular, donde el más citotóxico es *Thymus vulgaris* entre ambos. Si comparamos el  $IC_{50}$  de un quimioterápico en la línea UMSCC1, en la literatura encontramos el  $IC_{50}$  del cisplatino con valores aproximados de 0,662 g/mL (2 Mol/L) al mismo tiempo de evaluación de 72 hrs, lo encontrado por Sertel y cols. (2011a y 2011b) nos muestra que estos aceites esenciales serían mucho más potentes que este quimioterapéutico convencional sobre la misma línea celular (Ashimori y cols., 2009; Nör y cols., 2014).

Hay que mencionar que los aceites esenciales tienen diferentes propiedades físico-químicas, son de naturaleza hidrofóbica, inestables y volátiles, debido a esto una alternativa ha sido utilizar nanoemulsiones (NE), que ayudarían a estabilizar y proteger a los AE de la evaporación, degradación y lograr una liberación controlada. Los NE son sistemas coloidales que consisten en emulsionantes, tensioactivos y/o co-tensioactivos, aceite y agua, que con sus estructuras flexibles pueden solubilizar tanto fármacos hidrófilos como hidrófobos. El uso de NE permite potenciar la eficacia de los aceites esenciales, sobre todo en combinación con otros fármacos, como antineoplásicos, mejorando la solubilidad de los compuestos hidrófobos, así como la distribución y disponibilidad de los fármacos, lo que reduce concentración y frecuencia de dosis, generando menos efectos secundarios (Alkhatib, Al-Otaibi, y Wali, 2018; Jaafari-Ashkvandi y cols., 2019; Lai y cols., 2019). Teniendo esta



premisa, el uso de aceites esenciales a pesar de tener una viabilidad celular alta y un IC<sub>50</sub> menor o igual que otros fármacos utilizados de manera tradicional en el cáncer oral, no deberían ser descartados como alternativa terapéutica. En este trabajo solo dos estudios utilizaron nanoemulsiones, el aceite esencial de *Cuminum cyminum* que generó una inhibición de la viabilidad celular de 75 % y un IC<sub>50</sub> de 1,5 µL/mL en células SAS a las 48 hrs. y *Mentha Spicata*, que en mezcla con aceite de coco virgen mostró una inhibición de 82% sobre KON a las 24 hrs (Tabla 10). Al ser solo 2 estudios, que no comparten ninguna variable en común no es posible realizar una comparación, pero es importante destacar que esta estrategia se está ocupando en estudios *in vitro* en cáncer oral. Además, en la literatura se describe la utilidad de nanopartículas cargadas con Gefitinib (antineoplásico) y curcumina que mejoran la apoptosis celular en células SAS de cáncer oral humano *in vitro* e inhiben el tumor xenoinjerto de células SAS *in vivo*, a través del sistema de liberación de nanopartículas se superó la resistencia de las células cancerosas a este fármaco (Lai y cols., 2019). En el cáncer de cuello uterino, se utilizó el quimioterapéutico Mitomicina C en nanoemulsión combinado con aceite esencial de ajo y manzanilla, encontrando una disminución en las concentraciones mínimas inhibitorias y las viabilidades celulares de las células HeLa, medidas a través del ensayo MTT, se redujeron 42 y 20 veces cuando se sometieron a mitomicina-manzanilla y mitomicina-ajo, respectivamente versus el aceite esencial solo (Alkhatib, Al-Otaibi y Wali, 2018).

Debido a que no se publican las desviaciones estándares no se pudo realizar el análisis de comparación estadístico de los estudios incluidos.

## 7. CONCLUSIÓN

Tras el análisis de la literatura encontrada se determinó que los aceites esenciales son eficaces en la inhibición de la viabilidad celular sobre todo si es empleado como terapia de reemplazo para cáncer oral. Los aceites esenciales poseen distintos porcentajes de eficacia detallados por los diferentes autores que van desde el 48% y 99,3% de inhibición celular, encontrando aceites esenciales muy prometedores como *Cinnamomum Cassia* con 99,3% de inhibición. A pesar de esto, no existe todavía ningún aceite esencial que sea efectivo en lograr el 100% de inhibición de la viabilidad celular al ser comparados con los antineoplásicos tradicionales en cáncer oral.

Los aceites esenciales serían más potentes que los quimioterapéuticos tradicionales tras comparar las concentraciones efectivas 50, dicha característica sería beneficiosa en un futuro ya que posiblemente si se utilizan a nivel clínico tendrían menos efectos adversos que los antineoplásicos actuales.

En relación con el uso de aceites esenciales como coadyuvante a la terapia tradicional para cáncer oral, no se encontraron suficientes estudios, pero existiría un efecto potenciador *in vitro*, al utilizar un AE y dosis subletales de algunos antineoplásicos.

No se encontró evidencia respecto al efecto antitumoral *in vivo* del uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante para cáncer oral. Se recomienda realizar estudios en este ámbito con el fin de poder observar este efecto y dar un paso en la búsqueda de alternativas para tratar el cáncer oral.

Se concluye que existen diferencias en la viabilidad celular de células tumorales en modelo *in vitro* cuando se emplea el uso de aceites esenciales como terapia de reemplazo o coadyuvante comparado con la terapia tradicional para cáncer oral. Se sugiere seguir estudiando los aceites esenciales determinando a su vez el mecanismo de acción utilizado por estos, con el objetivo de ser utilizados como terapia de reemplazo para cáncer oral y/o aumentar las investigaciones respecto a su efecto potenciador de terapias convencionales con el fin de poder disminuir los efectos adversos y la resistencia farmacológica.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. (2012). The Artemisia L. genus: A review of bioactive essential oils. *Molecules*, Vol. 17, pp. 2542–2566. <https://doi.org/10.3390/molecules17032542>

Acevedo D, Navarro M, Montero P. (2013). *Composición Química del Aceite Esencial de las Hojas de Toronjil (Melissa officinalis L.) Chemical Composition of the Essential Oil from Lemon Balm Leaves (Melissa officinalis L.)*. 24(4), 49–54. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000400006>

Ahmad A., Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, Anwar F. (2013). A review on therapeutic potential of Nigella sativa: A miracle herb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(5), 337–352. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60075-1](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60075-1)

Alaufi OM, Noorwali A, Zahran F, Al-Abd AM, Al-Attas S. (2017). Cytotoxicity of thymoquinone alone or in combination with cisplatin (CDDP) against oral squamous cell carcinoma in vitro. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13357-5>

Alkhatib MH, Al-Otaibi WA, Wali AN. (2018). Antineoplastic activity of mitomycin C formulated in nanoemulsions-based essential oils on HeLa cervical cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 291, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.06.009>

Antón MS, & Pérez, S. M. (2015). Revisión de la literatura. En *Av. Odontoestomatol* 31(4), 247-259.

Antony M, Geetha RV. (2019). Study of anti-apoptotic activity of sage oil on oral cancer cell lines – An in vitro study. *Drug Invention Today*, 11(10), 2523–2526.

Arango O, Pantoja D, Santacruz Ch, Hurtado AM. (2012). Actividad antioxidante del aceite esencial de orégano. En *biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial* 10(2), 79-86.

Araújo CA, Leon LL. (2001). Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 723–728.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000500026>

Arcila CC, Loarca G, Lecona S, González E. (2004). El orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 54(1), 100–111.

Recuperado de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000100015](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015)

Ardila Jaimes CP. (2015). A La Medicina Tradicional China en la prevención de la enfermedad. *Rev Cienc Salud*, 13(2), 275–281. <https://doi.org/10.12804/revsalud13.02.2015.15>

Ashimori N, Zeitlin BD, Zhang Z, Warner K, Turkienicz IM, Spalding A. (2009). TW-37, a small-molecule inhibitor of Bcl-2, mediates S-phase cell cycle arrest and suppresses head and neck tumor angiogenesis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(4), 893–903. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-1078>

Asquino N, Victoria GM, Magdalena M, Ernesto A, Rossy B, Alexandro L. (2016). *Aceites Esenciales: Una opción quimioterapéutica en Periodoncia Essential-oils: a Chemotherapeutic Option in Periodontics* (Vol. 28).

Ávalos A, Pérez E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. REDUCA (Biología). *REDUCA (Biología)*, 2(3), 119–145. Recuperado de <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>

Avello M, SuwalskyM. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, (494), 161–172. <https://doi.org/10.4067/s0718-04622006000200010>

Aziz ZA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism*, 19(13), 1100–1110. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>

Bahar E, Akter KM, Lee GH, Lee HY, Rashid HO, Choi M, Yoon H. (2017).  $\beta$ -Cell protection and antidiabetic activities of *Crassocephalum crepidioides* (Asteraceae) Benth. S. Moore extract against alloxan-induced oxidative stress via regulation of apoptosis and reactive oxygen species (ROS). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1697-0>

Begnini KR, Nedel F, Lund RG, Carvalho PHDA, Rodrigues MRA, Beira FTA. (2014). Composition and antiproliferative effect of essential oil of *origanum vulgare* against tumor cell lines. *Journal of Medicinal Food*, 17(10), 1129–1133. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0063>

Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. (2013). Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3643–3653. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6267>

Cartes R, Moraga J. (2016). Pautas de chequeo, parte III: STROBE y ARRIVE. *Revista Chilena de Cirugia*, 68(5), 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.rchic.2015.12.003>

Cha JD, Jeong MR, Kim HY, Lee JC, Lee KY. (2009). MAPK activation is necessary to the apoptotic death of KB cells induced by the essential oil isolated from *Artemisia iwayomogi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(2), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.002>

Cha JD, Kim JY. (2012). Essential oil from *Cryptomeria japonica* induces apoptosis in human oral epidermoid carcinoma cells via mitochondrial stress and activation of caspases. *Molecules*, 17(4), 3890–3901. <https://doi.org/10.3390/molecules17043890>

Cha JD, Moon SE, Kim HY, Cha IH, Lee KY. (2009). Essential oil of *artemisia capillaris* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation mediated by MAPK-stimulated signaling pathway. *Journal of Food Science*, 74(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01355.x>

Chang WL, Cheng FC, Wang SP, Chou ST, Shih Y. (2016). Cinnamomum cassia essential oil and its major constituent cinnamaldehyde induced cell cycle arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells. *Environmental Toxicology*, 32(february), 456–468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/tox.22250>

Cortés-Rojas DF, De Souza CRF, Oliveira WP. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): A precious spice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), pp. 90–96. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60215-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60215-X)

Costa RGA, De Anunciação TA, Araujo M, Souza CA, Dias RB, Sales CBS, Bezerra DP. (2020). In vitro and in vivo growth inhibition of human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells by *Guatteria megalophylla* Diels (Annonaceae) leaf essential oil. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 122(November 2019), 109713. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109713>

D'souza S, Addepalli V. (2018, noviembre 1). Preventive measures in oral cancer: An overview. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 107, pp. 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.114>

Dai W, Sun C, Huang S, Zhou Q. (2016). Carvacrol suppresses proliferation and invasion in human oral squamous cell carcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 9, 2297–2304. <https://doi.org/10.2147/OTT.S98875>

De Assis Oliveira F, Andrade LN, De Sousa ÉBV, De Sousa DP. (2014). Anti-ulcer activity of essential oil constituents. *Molecules*, 19(5), pp. 5717–5747. <https://doi.org/10.3390/molecules19055717>

Descriptores en Ciencias de la Salud: DeCS [Internet]. ed. 2017. Sao Paulo (SP): BIREME / OPS / OMS. 2017 [actualizado 2017 May 18; citado 2017 Jun 13]. Disponible en: <http://decs.bvsalud.org/E/homepagee.htm>

De La Chapa JJ, Singha PK, Lee DR, Gonzales CB. (2018). Thymol inhibits oral squamous cell carcinoma growth via mitochondria-mediated apoptosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 47(7), 674–682. <https://doi.org/10.1111/jop.12735>

El-Garawani IM, El-Nabi SH, Dawoud GT, Esmail SM, Abdel Moneim A E. (2019). Triggering of apoptosis and cell cycle arrest by fennel and clove oils in Caco-2 cells: the role of combination. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 29(9), 710–722. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1650149>

Errázuriz FG. (2006). El pueblo Mapuche: Historia, medicina y proyectos de coexistencia en el área de la salud (segunda parte). *Revista Chilena de Pediatría*, 77(4), 399–404. <https://doi.org/10.4067/s0370-41062006000400011>

Escobar L, Aristizábal G, FA. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, 17(2), 173–180.

Escobar L, Rivera A, Aristizábal FA. (2008). *Comparison of resazurin and mtt methods on studies of cytotoxicity in human tumor cell lines*. *Vitae* 17(1), 67-74

Fekrazad R, Afzali M, Pasban-Aliabadi H, Esmaeili-Mahani S, Aminizadeh M, Mostafavi A. (2017). Cytotoxic effect of *Thymus caramanicus* Jalas on human oral epidermoid carcinoma KB cells. *Brazilian Dental Journal*, 28(1), 72–77. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201700737>

García V, Bascones, A. (2009). Cáncer oral: Puesta al día Cáncer oral: Puesta al día Update in oral cancer. En *Av. Odontoestomatol*, 25(5), 239-248.

García Kass AI, Domínguez Gordillo A A, García Núñez JA, Cancela Rivas G, Torres Salcines J, Esparza Gómez GC. (2013). Revisión y puesta al día en cáncer de lengua. *Avances en Odontoestomatología*, 29(5), 255–269. <https://doi.org/10.4321/S0213-12852013000500005>

Gautam N, Mantha AK, Mittal S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: A mechanistic view. *BioMed Research International*, Vol. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/154106>

Giordano A, Tommonaro G. (2019). Curcumin and cancer. *Nutrients*, Vol. 11(10), 2376. <https://doi.org/10.3390/nu11102376>

Gosepath EM, Eckstein N, Hamacher A, Servan K, Von Jonquieres G, Lage H, Kassack MU. (2008). Acquired cisplatin resistance in the head-neck cancer cell line Cal27 is associated with decreased DKK1 expression and can partially be reversed by overexpression of DKK1. *International Journal of Cancer*, 123(9), 2013–2019. <https://doi.org/10.1002/ijc.23721>

Hurtado D, Estrada J (2012). Oral Complications in Patients Undergoing Radiotherapy : a literature review. *Univ. Odontol.*, 31(67), 111–129.

ISO, International Organization for Standardization. (2013). ISO 9235:2013(en), Aromatic natural raw materials .Vocabulary. Recuperado 27 de mayo de 2020, de <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en>

Jaafari-Ashkvandi, Z., Shirazi, S. Y., Rezaeifard, S., Hamed, A., & Erfani, N. (2019). Cytotoxic Effects of Pistacia Atlantica (Baneh) Fruit Extract on Human KB Cancer Cell Line Cytotoxic effects of Baneh on KB cells 31. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 62(1), 30–34. <https://doi.org/10.14712/18059694.2019.43>

Ji N, Jiang L, Deng P, Xu H, Chen F, Liu J, Chen Q. (2017). Synergistic effect of honokiol and 5-fluorouracil on apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 46(3), 201–207. <https://doi.org/10.1111/jop.12481>

Jing CL, Huang RH, Su Y, Li YQ, Zhang CS. (2019). Variation in chemical composition and biological activities of flos chrysanthemi indicis essential oil under different extraction methods. *Biomolecules*, 9(10), 518. <https://doi.org/10.3390/biom9100518>

Jo JR, Park JS, Park YK, Chae YZ, Lee GH, Park GY, Jang BC. (2012). Pinus densiflora leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. *International Journal of Oncology*, 40(4), 1238–1245. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1263>

Kasahara Y, Endo K, Ueno T, Ueno H, Moriyama-Kita M, Odani A, Yoshizaki T.



(2019). Bone invasion-targeted chemotherapy with a novel anionic platinum complex (3Pt) for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, *110*(10), 3288–3295. <https://doi.org/10.1111/cas.14145>

Keawsa-ard S, Liawruangrath B, Liawruangrath S, Teerawutgulrag A, Pyne SG. (2012). Chemical constituents and antioxidant and biological activities of the essential oil from leaves of *Solanum spirale*. *Natural Product Communications*, *7*(7), 955–958. <https://doi.org/10.1177/1934578x1200700740>

Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. (2014). CRIS guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *Journal of Conservative Dentistry*, *17*(4), 301–304. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.136338>

Kubatka P, Uramova S, Kello M, Kajo K, Samec M, Jasek K, Büsselberg D. (2019). Anticancer activities of *thymus vulgaris* L. In experimental breast carcinoma in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071749>

Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>

Lai KC, Chueh FS, Hsiao YT, Cheng ZY, Lien JC, Liu KC, Chung JG. (2019). Gefitinib and curcumin-loaded nanoparticles enhance cell apoptosis in human oral cancer SAS cells in vitro and inhibit SAS cell xenografted tumor in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *382*, 114734. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114734>

León G, Osorio MR, Martínez SR. (2015). Comparison of two methods for extraction of essential oil from *Citrus sinensis* L. En *Revista Cubana de Farmacia* *49*(4), 742- 750. Recuperado de <http://scielo.sld.cu>

Leyva N, Gutiérrez EP, Vazquez G, Heredia JB. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6), 989. <https://doi.org/10.3390/molecules22060989>

Linde GA, Colauto NB, Albertó E, Gazim ZC. (2016). Quimiotipos, extração, composição e uso do óleo essencial de *Lippia alba*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 18(1), 191–200. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_037](https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_037)

Ma L, Chen J, Han H, Liu P, Wang H, Lin S, Zhang X. (2020). Effects of lemon essential oil and limonene on the progress of early caries: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 111, 104638. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104638>

Manosroi J, Dhumtanom P, Manosroi A. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Letters*, 235(1), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.021>

Mark AM. (2016). What you should know about oral cancer. *Journal of the American Dental Association*, 147(4), 312. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2016.02.001>

Matus MF, Jorquera M, Zúñiga J. (2017). Anti-proliferative effect of terpenes on human prostate cancer cells: Natural sources and their potential role as chemopreventive agents. *Revista Chilena de Nutricion*, 44(4), 371–382. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000400371>

Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, Altman DG. (2010). CONSORT 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ (Clinical research ed.)*, 340. <https://doi.org/10.1136/bmj.c869>

Mollashahee-Kohkan, F, Saravani R, Khalili T, Galavi H, Sargazi S. (2019). Levisticum Officinale Extract Triggers Apoptosis and Down-Regulates ZNF703 Gene Expression in Breast Cancer Cell Lines. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 8(2), 119–125. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31832434>

Nirmala MJ, Durai L, Rao KA, Nagarajan R. (2020). Ultrasonic nanoemulsification of cuminum cyminum essential oil and its applications in medicine. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 795–807. <https://doi.org/10.2147/IJN.S230893>

Nör C, Zhang Z, Warner KA, Bernardi L, Visioli F, Helman JI, Nör JE. (2014). Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. *Neoplasia (United States)*, 16(2), 137–146. <https://doi.org/10.1593/neo.131744>

Paredo H, Garcia E, Lopez A. (2009). *Aceites esenciales :métodos de extracción*. Recuperado de [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TsIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TsIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)

Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GLS, Freires IA, de Carvalho FG, Castellano LR, de Castro RD. (2017). Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*, 73, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.10.013>

Pezzani R, Salehi B, Vitalini S, Iriti M, Zuñiga FA, Sharifi-Rad J, Martins, N. (2019). Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: An update on the cancer perspective. *Medicina (Lithuania)*, 55(4). <https://doi.org/10.3390/medicina55040110>

Rajendra A, Noronha V, Joshi A, Patil VM, Menon N, Prabhash K. (2020). Palliative chemotherapy in head and neck cancer: balancing between beneficial and adverse effects. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 20(1), 17–29. <https://doi.org/10.1080/14737140.2020.1708197>

Ramírez FA, Plana A, Ferrandiz D. (1999). La aspirina. El medicamento del siglo. Recuperado 27 de mayo de 2020, de AMC vol.3 no.3 Camagüey may.-jun. 1999 website: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02551999000300011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000300011)

Riera P, Martínez B. (2005). Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en

Chile. *Revista Medica de Chile*, 133(5), 555–563. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872005000500007>

Sanseera D, Niwatananun W, Liawruangrath B, Liawruangrath S, Baramée A, Pyne SG. (2012). Chemical composition and biological activities of the essential oil from leaves of *Cleidion javanicum* bl. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 15(2), 186–194. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644035>

Sargazi ML, Saravani R, Shahraki AS. (2019). Hydroalcoholic extract of *Levisticum officinale* increases cGMP signaling pathway by down-regulating PDE5 expression and induction of apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-468 breast cancer cell lines. *Iranian Biomedical Journal*, 23(4), 280–286. <https://doi.org/10.29252/.23.4.280>

Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T. (2011a). Chemical composition and antiproliferative activity of essential oil from the leaves of a medicinal herb, *Levisticum officinale*, against UMSCC1 head and neck squamous carcinoma cells. *Anticancer Research*, 31(1), 185–191.

Sertel S, Eichhorn T, Plinkert PK, Efferth T. (2011b). Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*, 31(1), 81–87.

Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Iriti M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*, Vol. 22, p. 70. <https://doi.org/10.3390/molecules22010070>

Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, del Mar Contreras, M, Sharifi-Rad J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1675–1687. <https://doi.org/10.1002/ptr.6103>

Silva S, Alves N, Silva P, Vieira T, Maciel P, Castellano LR, Albuquerque D. (2019). Antibacterial Activity of *Rosmarinus officinalis*, *Zingiber officinale*, *Citrus aurantium bergamia*, and *Copaifera officinalis* Alone and in Combination with Calcium

Hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *BioMed research international*, 2019, 8129439. <https://doi.org/10.1155/2019/8129439>

Silvestre F, Puente A. (2008). Efectos adversos del tratamiento del cáncer oral. En *Av. Odontoestomatol*, 24(1), 111-121.

Skalicka K, Grzegorzczak A, Świątek Ł, Walasek M, Widelski J, Rajtar B, Elansary HO. (2017). Biological activity and safety profile of the essential oil from fruits of *Heracleum mantegazzianum* Sommier & Levier (Apiaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 109, 820–826. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.033>

Spyridopoulou K, Fitsiou E, Bouloukosta E, Tiptiri-Kourpeti A, Vamvakias M, Oreopoulou A, Chlichlia K. (2019). Extraction, Chemical Composition, and Anticancer Potential of *Origanum onites* L. Essential Oil. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(14), 2612. <https://doi.org/10.3390/molecules24142612>

Stefanowicz J, Ochocka JR. (2020). Real-time cell analysis system in cytotoxicity applications: Usefulness and comparison with tetrazolium salt assays. *Toxicology Reports*, 7, pp. 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.002>

Stepanenko AA, Dmitrenko VV. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*, 574(2), 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>

Stratakis, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. En *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 31–38). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>

Su YC, Ho CL. (2013). Composition and in-vitro cytotoxic activities of the leaf essential oil of *Beilschmiedia erythrophloia* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 8(1), 143–144. <https://doi.org/10.1177/1934578x1300800135>

Su YC, Ho CL. (2016). Composition of the leaf essential oil of *Phoebe formosana* from Taiwan and its in vitro cytotoxic, antibacterial, and antifungal activities. *Natural Product Communications*, 11(6), 845–848.

<https://doi.org/10.1177/1934578x1601100637>

Su YC, Ho CL. (2017). Composition, in vitro cytotoxicity, anti-mildew and anti-wood-decay fungal activities of the fruit essential oil of *Liquidambar formosana* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 12(2), 287–290. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701200237>

Su YC, Hsu KP, Ho CL. (2018). Composition, in vitro cytotoxicity, anti-mildew and anti-wood-decay fungal activities of the bark essential oil of *cunninghamia lanceolata* var. *konishii* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 13(6), 775–778. <https://doi.org/10.1177/1934578x1801300632>

Su YC, Hsu KP, Wang EIC, Ho CL. (2012). Composition, anticancer, and antimicrobial activities in vitro of the heartwood essential oil of *Cunninghamia lanceolata* var. *konishii* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 7(9), 1245–1247. <https://doi.org/10.1177/1934578x1200700938>

Su YC, Hsu KP, Wang EIC, Ho CL. (2013). Composition and in vitro anticancer activities of the leaf essential oil of *neolitsea variabilissima* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 8(4), 531–532. <https://doi.org/10.1177/1934578x1300800432>

Thakur S, Koundal R, Kumar D, Maurya AK., Padwad YS, Lal B, Agnihotri VK. (2019). *Volatile Composition and Cytotoxic Activity of Aerial Parts of Crassocephalum crepidioides growing in Western Himalaya , India.* (February).

Tilaoui M, Mouse HA, Jaafari A, Ziyad A. (2015). Comparative phytochemical analysis of essential oils from different biological parts of *artemisia herba alba* and their cytotoxic effect on cancer cells. *PLoS ONE*, 10(7), 131799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131799>

Tubtimsri S, Limmatvapirat C, Limsirichaikul S, Akkaramongkolporn P, Inoue Y, Limmatvapirat S. (2018). Fabrication and characterization of spearmint oil loaded nanoemulsions as cytotoxic agents against oral cancer cell. *Asian Journal of*

*Pharmaceutical Sciences*, 13(5), 425–437.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.02.003>

UICC. Union for International Cancer Control (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours*. (Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, ). Recuperado <https://www.legeforeningen.no/contentassets/201604933ce448e888a101ab969a4205/tnm-classification-of-malignant-tumours-8th-edition.pdf>

Valdivieso M, Gomez C, Plaza J, Gil Á. (2019, noviembre 1). Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: A systematic review. *Nutrients*, 11(11), 2786. <https://doi.org/10.3390/nu11112786>

Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>

Yang XQ, Zheng H, Ye Q, Li RY, Chen Y. (2015). Essential oil of Cinnamon exerts anti-cancer activity against head and neck squamous cell carcinoma via attenuating epidermal growth factor receptor - Tyrosine kinase. *Journal of B.U.ON.*, 20(6), 1518– 1525.

Yeruva L, Hall C, Elegbede JA, Carper SW. (2010). Perillyl alcohol and methyl jasmonate sensitize cancer cells to cisplatin. *Anti-Cancer Drugs*, 21(1), 1–9. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32832a68ad>

Yin QH, Yan FX, Zu XY, Wu YH, Wu XP, Liao MC, Zhuang YZ. (2012). Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. *Cytotechnology*, 64(1), 43–51. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9389-y>

Yusuf M, Gaskins J, Tennant P, Bumpous J, Dunlap N. (2019). Survival Impact of Time to Initiation of Adjuvant Radiation for Merkel Cell Carcinoma: An Analysis of the National Cancer Database. *Practical radiation oncology*, 9(4), e372–e385. <https://doi.org/10.1016/j.prro.2019.03.004>

Zeng Q, Che Y, Zhang Y, Chen M, Guo Q, Zhang W. (2020). Thymol Isolated from *Thymus vulgaris* Inhibits Colorectal Cancer Cell Growth and Metastasis by Suppressing the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *Drug Design, Development and Therapy, Volume 14*, 2535–2547. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S254218>

Zermeño F. (2004). Acido acetil salicílico en el tratamiento de las cefaleas. Recuperado 27 de mayo de 2020, de arch neurocién 2004; vol. 9(1):34-38  
website:[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0187-47052004000100007](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0187-47052004000100007)

Zhang C, Fan L, Fan S, Wang J, Luo T, Tang Y, Yu L. (2019). *Cinnamomum cassia* Presl: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Molecules, 24*(19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193473>

Zhou Y, Shen J, Xia L, Wang Y. (2015). Curcuma zedoaria (Berg.) Rosc. essential oil and paclitaxel synergistically enhance the apoptosis of SKOV3 cells. *Molecular Medicine Reports, 12*(1), 1253–1257. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3473>

## 9. ANEXOS Y APÉNDICES:

- 1) Tablas con el sistema de estadiaje de TNM (tumor-nodo-metástasis) para cáncer oral obtenido de UICC, 2017

### Definición categoría T para cáncer oral

CATEGORÍA	Diámetro máximo	Profundidad de invasión
T		
T1	≤ 2cm	≤ 5mm
T2	≤ 2cm	5-10mm
O	2-4cm	≤ 10mm
T3	>4 cm	
O		>10 mm
T4	Enfermedad avanzada invadiendo hueso o estructuras adyacentes	



**Definición categoría M para cáncer oral**

<b>M0</b>	Sin metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia

**Definición categoría N para cáncer oral**

<b>CATEGORÍA N</b>		<b>Tamaño de metástasis</b>	<b>ENE</b>
<b>N0</b>	Sin metástasis ganglionares.		
<b>N1</b>	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral.	≤3cm	No
<b>N2</b>			
<b>N2A</b>	Metástasis en un solo ganglio ipsilateral.	3-6cm	No
<b>N2B</b>	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales.	≤6cm	No
<b>N2C</b>	Metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales	≤6cm	No
<b>N3</b>			
<b>N3A</b>	Metástasis en cualquier ganglio linfático	>6cm	No
<b>N3B</b>	Metástasis en cualquier ganglio linfático	Cualquiera	Si
<b>ENE: EXTENSIÓN EXTRANODAL</b>			

Luego de la clasificación TNM se puede dar un estadio o etapa al tumor que va desde Etapa 0 hasta Etapa IV.

<b>Etapa</b>	<b>Categoría T</b>	<b>Categoría N</b>	<b>Categoría M</b>
<b>Etapa 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Etapa I</b>	T1	N0	M0
<b>Etapa II</b>	T2	N0	M0

<i>Etapa III</i>			T3	N0	M0
			T1, T2, T3	N1	M0
<i>Etapa IVA</i>	T4a	N0,N1	M0		
	T1,T2,T3,T4a	N2	M0		
<i>Etapa IVB</i>	Cualquier T	N3	M0		
	T4b	Cualquier N	M0		
<i>Etapa IVC</i>	Cualquier T	Cualquier N	M1		

*Tis: Carcino mainsitu*

2) Lista de verificación adaptada CONSORT 2010 para incluir al informar un estudio *in vitro* (Moher y cols., 2010).

Sección / Tema	Elemento de lista de verificación
Título y resumen	Identificación como un estudio <i>in vitro</i> .
	Resumen estructurado del estudio, métodos, resultados y conclusiones.
Trasfondo objetivos y	Antecedentes científicos y explicación de la justificación.
	Objetivos específicos o hipótesis
Metodología (materiales métodos) y	Descripción de materiales y métodos a utilizar.
	Detalle de obtención y cultivo de líneas celulares.
	Las intervenciones para cada línea celular, detalles suficientes para permitir la replicación, incluido cómo, cuanto y cuándo se administraron realmente
	Cambios importantes en los métodos después del comienzo con razones
Resultados	Medidas de resultado de cada intervención incluyendo cómo y cuándo fueron evaluadas

	Métodos para análisis adicionales
	Narración de los resultados o utilización de tablas, esquemas, gráficos para mostrar los resultados de los eventos a estudiar
Discusión	Limitaciones del estudio, abordando fuentes de sesgo potencial, imprecisión.
	Interpretación consistente con resultados, balance de beneficios y daños, y considerando otra evidencia relevante

3) Lista de verificación CONSORT 2010 de información para incluir al informar un ensayo aleatorio (Moher y cols., 2010).

Sección / Tema	Elemento de lista de verificación
Título y resumen	Identificación como un ensayo aleatorizado en el título.
	Resumen estructurado del diseño del ensayo, métodos, resultados y conclusiones.
Trasfondo y objetivos	Antecedentes científicos y explicación de la justificación.
	Objetivos específicos o hipótesis
Diseño de prueba	Descripción del diseño del ensayo (como paralelo, factorial), incluida la relación de asignación
	Cambios importantes en los métodos después del comienzo del ensayo (como los criterios de elegibilidad), con razones
Participantes.	Criterios de elegibilidad para los participantes.
	Configuraciones y ubicaciones donde se recopilaron los datos
Intervenciones	Las intervenciones para cada grupo con detalles suficientes para permitir la replicación, incluido cómo y cuándo se administraron realmente

Resultados	Medidas de resultado primarias y secundarias predefinidas completamente definidas, incluyendo cómo y cuándo fueron evaluadas
	Cualquier cambio en los resultados del ensayo después del comienzo del ensayo, con razones
Tamaño de la muestra	Cómo se determinó el tamaño de la muestra
	Cuando corresponda, explicación de cualquier análisis intermedio y pautas de detención.
Aleatorización	
Generación de secuencia	Método utilizado para generar la secuencia de asignación aleatoria
	Tipo de aleatorización; detalles de cualquier restricción (como bloqueo y tamaño de bloque)
Mecanismo de ocultación de la asignación	Mecanismo utilizado para implementar la secuencia de asignación aleatoria (como contenedores numerados secuencialmente), que describe los pasos tomados para ocultar la secuencia hasta que se asignaron las intervenciones
Implementación	Quién generó la secuencia de asignación aleatoria, quién inscribió a los participantes y quién asignó a los participantes a las intervenciones.
Cegador	Si se hizo, quién fue cegado después de la asignación a las intervenciones (por ejemplo, participantes, proveedores de atención, aquellos que evalúan los resultados) y cómo
	Si es relevante, descripción de la similitud de las intervenciones.
métodos de estadística	Métodos estadísticos utilizados para comparar grupos para resultados primarios y secundarios
	Métodos para análisis adicionales, como análisis de subgrupos y análisis ajustados.

Flujo de participantes (se recomienda un diagrama)	de	Para cada grupo, el número de participantes que fueron asignados al azar, recibieron el tratamiento previsto y fueron analizados para el resultado primario
	(se recomienda un diagrama)	Para cada grupo, pérdidas y exclusiones después de la asignación al azar, junto con razones
Reclutamiento		Fechas que definen los períodos de reclutamiento y seguimiento.
		Por qué terminó o se detuvo el juicio
Datos de referencia	de	Una tabla que muestra las características demográficas y clínicas de referencia para cada grupo
Números analizados		Para cada grupo, el número de participantes (denominador) incluido en cada análisis y si el análisis fue por grupos asignados originales
Resultados estimación	y	Para cada resultado primario y secundario, resultados para cada grupo y el tamaño del efecto estimado y su precisión (como el intervalo de confianza del 95%)
		Para los resultados binarios, se recomienda la presentación de los tamaños de efecto absoluto y relativo.
Análisis auxiliares		Resultados de cualquier otro análisis realizado, incluidos los análisis de subgrupos y los análisis ajustados, distinguiendo los preespecificados de los exploratorios
Daños		Todos los daños importantes o efectos no deseados en cada grupo
Limitaciones		Limitaciones de prueba, abordando fuentes de sesgo potencial, imprecisión y, si es relevante, multiplicidad de análisis
Generalización		Generalización (validez externa, aplicabilidad) de los hallazgos del ensayo.
Interpretación		Interpretación consistente con resultados, balance de beneficios y daños, y considerando otra evidencia relevante

4) Lista de chequeo de pauta *ARRIVE* para evaluar estudios en animales (Cartes-Velasquez y Moraga, 2016)

ITEM	Recomendaciones
<b>Título y Resumen</b>	<p>1. Título: Descripción exacta y concisa como sea posible sobre el contenido del artículo.</p> <p>2. Resumen: Incluye los antecedentes y objetivos de la investigación, detalles de la especie y cepa de los animales utilizados, métodos relevantes, hallazgos principales y conclusiones del estudio</p>
<b>Introducción</b>	<p>3. Antecedentes: Antecedentes que permitan comprender la motivación y el contexto del estudio, así como las bases y el enfoque experimental. Explicar cómo y por qué la especie y el modelo animal utilizados permiten abordar los objetivos científicos y, cuando sea apropiado, la relevancia del estudio para la biología humana.</p> <p>4. Objetivos: Describir claramente los objetivos primarios y secundarios del estudio o las hipótesis específicas que se van a probar.</p>
<b>Métodos</b>	<p>5. Declaración ética: indicar la naturaleza de los permisos del comité ético, leyes (en Chile la ley 20.380 regula la protección de animales) o decretos pertinentes, y las directrices nacionales o institucionales para el cuidado y uso de animales (aspectos bioéticos de la experimentación animal de CONICYT), bajo las que se realiza la investigación.</p> <p>6. Diseño del estudio: para cada experimento detallar: a) el número de grupos experimentales y control; b) cualquier medida adoptada para minimizar los efectos de sesgo al asignar los animales a los grupos de tratamiento (asignación aleatoria) y al evaluar los resultados (enmascaramiento), y c) la unidad experimental (animal, grupos o jaulas de animales). Los diagramas de flujo pueden ser útiles para ilustrar cómo se realizaron los diseños de estudio complejos.</p>

7. Procedimientos experimentales: Detalles precisos de todos los procedimientos efectuados. El cómo (formulación y dosis del tratamiento, el sitio y la vía de administración, anestesia y analgesia utilizadas [incluyendo la monitorización], procedimiento quirúrgico, el método de eutanasia, equipo especializado utilizado [incluyendo proveedores]); el cuándo (fecha y hora); el dónde (jaula de alojamiento, laboratorio, prueba del laberinto acuático, etc.), y el por qué (fundamentos para la elección del anestésico específico, la vía de administración, dosis del fármaco utilizado, etc.).

8. Animales de experimentación: caracterizar a los animales utilizados, incluyendo especie, cepa, sexo, etapa de desarrollo (edad media o mediana de edad y rango u otra medida resumen) y peso (media o mediana más rango de peso u otra medida resumen); procedencia de los animales, nomenclatura internacional de la cepa, modificación genética (animal deficiente, transgénico, etc.), genotipo, estado de salud/inmune, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido tratamientos anteriormente, procedimientos previos, etc.

9. Alojamiento y manejo de los animales: Proporcionar datos sobre el alojamiento (tipo de instalación, libre de patógenos específicos [LPE], tipo de jaula o habitáculo, material del lecho, número de animales por jaula, forma y material del tanque, etc. para peces); condiciones de cría (por ej., programa de reproducción, ciclo de luz/oscuridad, temperatura, calidad de agua, etc. para peces, el tipo de5. Declaración ética: indicar la naturaleza de los permisos del comité ético, leyes (en Chile la ley 20.380 regula la protección de animales) o decretos pertinentes, y las directrices nacionales o institucionales para el cuidado y uso de animales (aspectos bioéticos de la experimentación animal de CONICYT), bajo las que se realiza la investigación.

6. Diseño del estudio: para cada experimento detallar: a) el número de grupos experimentales y control; b) cualquier medida adoptada para minimizar los efectos de sesgo al asignar los animales a los grupos de tratamiento (asignación aleatoria) y al evaluar los resultados (enmascaramiento), y

c) la unidad experimental (animal, grupos o jaulas de animales). Los diagramas de flujo pueden ser útiles para ilustrar cómo se realizaron los diseños de estudio complejos.

7. Procedimientos experimentales: Detalles precisos de todos los procedimientos efectuados. El cómo (formulación y dosis del tratamiento, el sitio y la vía de administración, anestesia y analgesia utilizadas [incluyendo la monitorización], procedimiento quirúrgico, el método de eutanasia, equipo especializado utilizado [incluyendo proveedores]); el cuándo (fecha y hora); el dónde (jaula de alojamiento, laboratorio, prueba del laberinto acuático, etc.), y el por qué (fundamentos para la elección del anestésico específico, la vía de administración, dosis del fármaco utilizado, etc.).

8. Animales de experimentación: caracterizar a los animales utilizados, incluyendo especie, cepa, sexo, etapa de desarrollo (edad media o mediana de edad y rango u otra medida resumen) y peso (media o mediana más rango de peso u otra medida resumen); procedencia de los animales, nomenclatura internacional de la cepa, modificación genética (animal deficiente, transgénico, etc.), genotipo, estado de salud/inmune, si los animales han sido incluidos en estudios o recibido tratamientos anteriormente, procedimientos previos, etc.

9. Alojamiento y manejo de los animales: Proporcionar datos sobre el alojamiento (tipo de instalación, libre de patógenos específicos [LPE], tipo de jaula o habitáculo, material del lecho, número de animales por jaula, forma y material del tanque, etc. para peces); condiciones de cría (por ej., programa de reproducción, ciclo de luz/oscuridad, temperatura, calidad de agua, etc. para peces, el tipo de alimentación, el acceso a los alimentos y al agua, enriquecimiento ambiental); evaluaciones e intervenciones relacionadas con el bienestar que se llevaron a cabo antes, durante o después del experimento.

10. Tamaño de la muestra: Especificar el número total y por cada grupo experimental. Explicar cómo se determinó el número de animales total y para cada grupo experimental. Proporcionar detalles del cálculo del tamaño de la muestra empleado. Indicar el número de repeticiones independientes de cada experimento, si es que se realizaron.

11. Asignación de animales a grupos experimentales: Proporcionar detalles completos de la forma en que los animales fueron asignados a los distintos grupos experimentales, fuese distribución aleatoria o asignación específica. Describir el orden en el que los animales en los diferentes grupos experimentales fueron tratados y evaluados.



<p><b>Resultados</b></p>	<p>12. Resultados experimentales: Definir claramente los resultados primarios y secundarios a evaluar (muerte celular, marcadores moleculares, cambios de comportamiento, etc.).</p> <p>13. Métodos estadísticos: Proporcionar detalles sobre los métodos estadísticos utilizados para cada análisis; especificar la unidad de análisis para cada grupo de datos (animal, grupo de animales, neurona individual, etc.); describir los métodos utilizados para los supuestos estadísticos de las pruebas utilizadas (independencia, normalidad, etc.).</p> <p>14. Datos basales: para cada grupo experimental, indicar las características relevantes y el estado de salud de los animales (peso, estado microbiológico, participación en estudios previos, etc.) antes de iniciar el tratamiento o prueba.</p> <p>15. Cantidades analizadas: indicar el número de animales de cada grupo incluido en cada análisis. Presentar números absolutos y no frecuencias; explicar pérdidas o exclusión de datos en el análisis.</p> <p>16. Resultados y estimación: indicar los resultados de cada análisis llevado a cabo con una medida de precisión (error estándar, intervalo de confianza, etc.).</p> <p>17. Eventos adversos: dar detalles de todos los eventos adversos importantes en cada grupo experimental, y las modificaciones realizadas a los protocolos con el fin de reducir los eventos adversos.</p>
<p><b>Discusión</b></p>	<p>18. Interpretación e implicaciones científicas: interpretar los resultados, teniendo en cuenta los objetivos y las hipótesis del estudio, la teoría actual y otros estudios pertinentes en la literatura. Comentar las limitaciones del estudio incluyendo cualquier fuente potencial de sesgo, cualquier limitación del modelo animal y la imprecisión asociada con los resultados. Describir cualquier implicación de los métodos experimentales o hallazgos para el reemplazo, refinamiento o reducción (las 3 R) del uso de los animales en investigación.</p> <p>19. Generalización/aplicabilidad: comentar la validez externa de los resultados y de qué forma se lograría, así como la relevancia para la biología humana.</p> <p>20. Financiamiento: listar todas las fuentes de financiación (incluyendo el número del proyecto) y su rol en el estudio.</p>