

Inhibición del Transporte de Protones como estrategia terapéutica del Adenocarcinoma de Esófago: estudio in vitro

— — —

Proton Transport Inhibition as a therapeutic strategy of Esophageal Adenocarcinoma: in vitro study

Alumno: **Beatriz Ferruz Martos**, Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza
Directora: Dra. Elena Piazuelo, Investigadora Senior IACS. Profesora Asociada Universidad de Zaragoza. IIS Aragón.
Codirector: Dr. Eduardo Chueca, Investigador postdoctoral. CIBERehd

Este estudio ha sido posible gracias a la financiación del instituto de Salud Carlos III (proyecto PI 14/01931)

INDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCION	6
1. Adenocarcinoma de Esófago	7
1.1. Lesiones Precursoras	
a) Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico	
b) Esófago de Barret	
c) Transformación Neoplásica	
2. Homeostasis del pH Tumoral	10
2.1. Consecuencias de la Acidez Tumoral	
a) Capacidad Invasiva	
b) Resistencia a los quimioterápicos	
c) Inmunosupresión	
2.2 Acidificación como diana terapéutica	
a) NHE1	
b) V-ATPasa	
c) MCT 1 y MCT 4	
3. IBP como Fármacos Antineoplásicos	16
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS	20
1. Líneas Celulares/Mantenimiento	20
2. Métodos de Cultivo	20
2.1 Descongelación Celular	
2.2 Subcultivo Celular	
2.3. Adición tratamiento a cultivos	
a) Esomeprazol	

b) AZD3965

c) Solución D(+)Glucosa

3. Determinación de la Expresión del Transportador MCT1 mediante IHQ	22
4. Determinación de la concentración de Lactato intracelular	23
5. Determinación de Apoptosis	23
6. Análisis del Ciclo Celular	24
7. Análisis Estadístico	25
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	39
ANEXOS	40
BIBLIOGRAFÍA	42

RESUMEN

La alteración del gradiente de pH intra/extracelular consecuencia del aumento de expresión de transportadores de H^+ de membrana es una característica de las células neoplásicas que tiene un enorme impacto en el metabolismo energético de la célula y se ha visto implicado tanto en la transformación neoplásica como en la progresión y metástasis de los tumores.

OBJETIVO

Evaluar el efecto que la inhibición farmacológica de diferentes transportadores de protones, en concreto la bomba de protones $V\text{-}H^+\text{ATPasa}$ y el transportador MCT1, ejerce sobre los fenómenos de proliferación y apoptosis en una línea celular de adenocarcinoma de esófago.

MÉTODOS

Se utilizó una línea de células de adenocarcinoma de esófago humano (OE33) que expresa $V\text{-}H^+\text{ATPasa}$ a nivel de membrana. Se evaluó la expresión de MCT1 (inmunocitoquímica), concentración intracelular de lactato, apoptosis y proliferación (citometría de flujo). Se analizó el efecto de Esomeprazol (para inhibir la $V\text{-}H^+\text{ATPasa}$ y de AZD3965 (inhibidor selectivo de MCT1) en dos condiciones experimentales (con/sin sobrecarga de glucosa).

RESULTADOS

La línea OE33 expresa el transportador MCT1. El tratamiento con Esomeprazol a concentraciones altas indujo la apoptosis e inhibió la proliferación celular. La presencia de mayor concentración de glucosa en el medio (30 mM) aumentó la concentración de lactato intracelular, aumentó el efecto pro-apoptótico de Esomeprazol pero revirtió el efecto anti-proliferativo del mismo. El tratamiento de las células con el inhibidor de MCT1, AZD3965, a pesar de que indujo un aumento del lactato intracelular, no produjo ningún efecto en la proliferación ni en la apoptosis de las células OE33.

CONCLUSIÓN

Esomeprazol a alta concentración ejerce efectos antineoplásicos en células de adenocarcinoma de esófago humano, induciendo la apoptosis e inhibiendo la proliferación. La presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo potencia el efecto proapoptótico de Esomeprazol pero revierte el efecto antiproliferativo del mismo. A pesar de que la línea celular empleada expresa MCT1 y que su inhibición con AZD3965 aumenta la concentración de lactato intracelular, no ejerce ningún efecto citotóxico en las células OE33.

ABSTRACT

Disturbance of intra/extracellular pH gradient, as a consequence of overexpression of some membrane- bound proton transporters is a feature of neoplastic cells, which has a profound impact on cell metabolism and has been recurrently shown to be involved in neoplastic transformation as well as tumoral progression and metastasis-

OBJETIVE

To evaluate the impact of pharmacological inhibition of different proton transporters, specifically V-H+ATPasa and MCT1 transporter, on proliferation and apoptosis in a cell line of human esophageal adenocarcinoma.

METHODOLOGY

A cell line of human esophageal adenocarcinoma (OE33) which expresses the proton pump V-H+ATPasa at cell membrane was used. The expression of MCT1 (immunohistochemistry), lactate intracellular levels, cell apoptosis and proliferation (flow cytometry) were analyzed. The effect of Esomeprazol (V-H+ATPasa inhibitor) and AZD3965 (selective MCT1 inhibitor) was tested in two different conditions (standard/high glucose concentration in culture medium).

RESULTS

The cell line OE33 expressed the MCT1 transporter. High concentrations of Esomeprazole induced apoptosis and inhibited cell proliferation. High concentration of glucose in culture medium (30mM) increased intracellular lactate concentration, increased the apoptotic effect but reversed the anti-proliferative effect of Esomeprazole. Although treatment with the MCT1 selective inhibitor increased intracellular lactate content, it has no effect on cell proliferation or apoptosis.

CONCLUSION

High concentration of Esomeprazole displays antineoplastic effects in a cell line of human esophageal adenocarcinoma, increasing apoptosis and inhibiting proliferation. High glucose concentration in cell culture medium enhanced the apoptotic effect but reversed the anti proliferative effect induced by Esomeprazole. Although the cell line expressed MCT1 and the inhibition with AZD3965 increased intracellular lactate content, it did not induce a cytotoxic effect on OE33 cells.

INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma de esófago es el tumor sólido cuya incidencia ha experimentado mayor aumento en las tres últimas décadas en países occidentales⁽¹⁾. Las causas de este aumento no son del todo conocidas, aunque se cree que está en relación con un aumento de la incidencia de Esófago de Barrett (EB), ya que hasta el momento es el principal factor de riesgo para el desarrollo de este tumor.

El EB es una enfermedad que surge como consecuencia de la exposición prolongada al reflujo gastroesofágico (RGE). En la mayoría de los pacientes de enfermedad por RGE, el tejido dañado por el reflujo es sustituido por tejido epitelial sano, pero en una minoría de los pacientes (aproximadamente el 10% de los pacientes con ERGE) el epitelio esofágico es sustituido por epitelio metaplásico de tipo intestinal, lo que se conoce como EB siendo, el principal factor de riesgo conocido para el desarrollo de ACE, de manera que los pacientes con EB tienen de 30 a 50 veces más riesgo de desarrollar esta neoplasia que la población general.

El incremento de los factores que aumentan el RGE como tabaquismo, alcohol, dieta con alto contenido en grasa y obesidad podrían estar relacionados también con el incremento en los casos de ACE⁽²⁾.

A pesar de la aplicación de cirugía combinada con terapias neoadyuvantes, este cáncer tiene muy mal pronóstico, con una tasa de supervivencia a 5 años inferior al 20%, lo que nos pone de manifiesto la necesidad de desarrollar técnicas de diagnóstico de la progresión neoplásica en una etapa precoz, en la que las probabilidades de curación son superiores y, la necesidad de investigar nuevas estrategias terapéuticas que permitan incrementar la tasas de supervivencia en pacientes con enfermedad más avanzada.

En la transformación maligna de una célula se acumulan una serie de alteraciones: pérdida de los mecanismos de control de la proliferación, adquisición de inmortalidad, capacidad de invasión de otros tejidos y promoción de angiogénesis⁽³⁾. Algunas de estas alteraciones están presentes desde etapas muy iniciales de la transformación metaplásica y se van acumulando conforme el grado de la lesión aumenta.

1. ADENOCARCINOMA DE ESÓFAGO

1.1 Lesiones Precursoras

a) Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico

La ERGE es una condición crónica que se desarrolla cuando el reflujo del estómago provoca síntomas y/o complicaciones³⁽⁴⁾. Se considera enfermedad multifactorial, pero se cree que el aumento global en la incidencia de la obesidad estaría relacionado ya que provoca una elevación de la presión intraabdominal, lo que promueve el reflujo y el desarrollo de hernia de hiato⁽⁵⁾. Las principales complicaciones asociadas a la ERGE son: esofagitis erosiva, esófago de Barrett (EB) y adenocarcinoma de esófago (ACE).

b) Esófago de Barret

Es un proceso patológico adquirido relacionado con el RGE crónico de jugo gástrico ácido y/o contenido intestinal rico en bilis, hacia esófago⁽⁶⁻⁸⁾, implicando otros factores como el tabaco, el alcohol⁽⁹⁾. Respecto a la bacteria *H.Pylori* se ha demostrado que puede colonizar el epitelio metaplásico pero no existen evidencias de que sea factor de riesgo^(10,11). También se ha sugerido la posible existencia de alguna alteración genética que predisponga al desarrollo de EB⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Se estima que el riesgo a desarrollar ACE en pacientes con EB se encuentra entre el 0'1 y el 0'3 %/año⁽¹⁵⁾. Esta progresión es un proceso complejo con varias etapas que se caracterizan por cambios histológicos en la mucosa: inflamación, metaplasia, displasia (bajo y alto grado, DBG y DAG respectivamente), carcinoma in situ y por último adenocarcinoma invasivo⁽¹⁶⁾. Hoy en día la determinación del grado displasia es considerado el "gold standard" para estratificar el riesgo de progresión a ACE.

Las guías para diagnóstico, vigilancia y tratamiento del EB publicadas por la American Gastroenterological Association (AGA), recomiendan vigilancia endoscópica cada 3 años en pacientes sin displasia; repetir la prueba a los 6 meses si encontramos DBG en la primera y, si tras este tiempo no se encuentra nuevamente epitelio displásico realizar prueba endoscópica anualmente hasta obtener dos negativas consecutivas. Ante un hallazgo de DAG hay que repetir la endoscopia a los 3 meses⁽¹⁷⁾ pero, aun así, no se ha conseguido una estratificación adecuada del riesgo utilizando ninguna de estas categorías^(18,19).

El patrón de los episodios de reflujo tiene relevancia en la progresión neoplásica, porque las células expuestas a pulsos de ácido (exposición aguda) tienden a proliferar y, las expuestas de manera más continua (exposición crónica) tienden a diferenciarse, disminuyendo el riesgo de progresión a displasia⁽²⁰⁾. Las células metaplásicas de la mucosa de Barrett tienen una tasa proliferativa superior a las células normales, y esta actividad se incrementa durante la exposición al ácido, por la activación de vías mitógenas que

aumentan la proliferación y disminuyen la apoptosis⁽²¹⁾, lo que podría tener el objetivo de acelerar la curación de las lesiones provocadas por el reflujo.

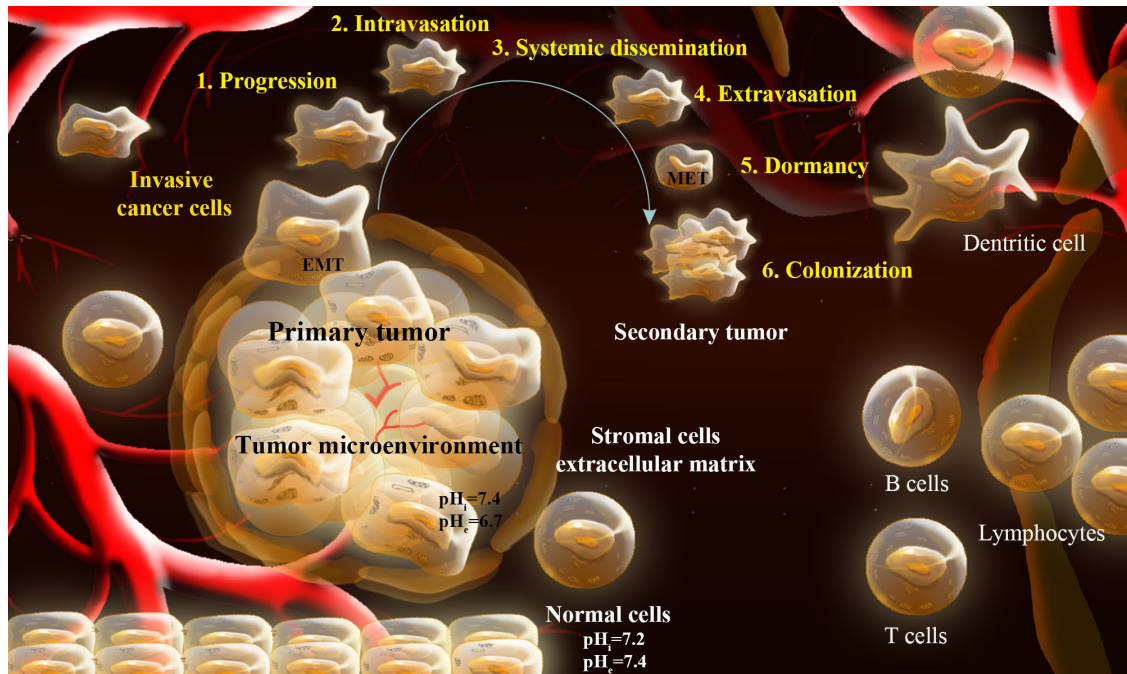


Figura 1. Proceso transformación neoplásica. Las células del tumor primario migran a tejidos contiguos (1:Progresión). Las células neoplásicas invaden linfáticos y vasos sanguíneos (2: Intravasation), viajan a través de la circulación (3: Disemination), hasta diferentes localizaciones donde salen de la circulación (4:Extravasation) y se alojan sobreviviendo y proliferando (5:Dormancy) dando lugar a micrometastasis del proceso primario (6:Colonization)

FUENTE: Jaleh Barar, Yadollah Omid. *Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy*. *BiolImpacts*, 2013, 3(4), 149-162

Podemos disminuir esta exposición al ácido en el EB mediante procedimientos quirúrgicos o por tratamientos farmacológicos. El *tratamiento médico* está basado en la administración pautada de inhibidores de la bomba de protones (IBP), fármacos muy específicos que necesitan unos valores de pH muy bajos y con una vida media corta (aprox. 1h) por lo que, se eliminan de forma rápida sin llegar a alcanzar altas concentraciones plasmáticas que podrían ser potencialmente tóxicas.

En esta patología donde los efectos dañinos de la exposición al ácido son importantes, es lógico pensar que un incremento del pH del reflujo (haciéndolo menos ácido), sería beneficioso para el paciente. Así la normalización del pH intraesofágico alivia los síntomas del reflujo, favorece la diferenciación y disminuye la proliferación celular⁽²²⁾ que debería reducir el riesgo de displasia y ACE pero, por el contrario a lo que se pensaba, se ha producido un aumento en la tasa del ACE a pesar del uso generalizado de IBP⁽²³⁾.

Hay controversia en el efecto beneficioso de los IBP en la quimiopprofilaxis del ACE, existen estudios que indican que reducen el riesgo de desarrollar DAG y ACE en pacientes con EB⁽²⁴⁻²⁷⁾, otros no observan una reducción clara de este riesgo^(28,29) y otros muestran que los IBP incrementan el riesgo de desarrollar ACE⁽³⁰⁻³³⁾.

c) Transformación neoplásica

Además de la presencia de EB, son factores de riesgos conocidos para el desarrollo de ACE, el sexo masculino, la obesidad, edad superior a 50 años, raza blanca, el tabaquismo y el antecedente familiar de ACE^(34,35). y se sospecha de otros mecanismos que podrían estar también implicados en su progresión.

2. HOMEOSTASIS pH TUMORAL

La investigación del cáncer se ha centrado en caracterizar las diferencias existentes entre los diversos tipos de tumores para desarrollar un tratamiento específico para cada uno, pero aún así muchos responden mal a los tratamientos convencionales y actualmente el éxito de las terapias oncológicas depende de una detección temprana de la enfermedad.

Los tumores comparten una serie de características metabólicas y fisiológicas diferentes del metabolismo de las células normales entre las que destacamos, modificaciones en los mecanismos encargados de regular el pH tumoral y la alteración del metabolismo glucolítico que, han dado lugar a la aparición de nueva línea de investigación, centrada en estudiar y atacar éstas características comunes con objeto de desarrollar un tratamiento que permita tratar selectiva y eficazmente el cáncer sin dañar las células sanas

Algunas células tumorales se desarrollan en ambientes de hipoxia debido una perfusión pobre, consecuencia de una vasculatura anormal y un crecimiento incontrolado, lo que provoca una distribución irregular del flujo sanguíneo tumoral; encontramos así regiones con bajas tensiones de oxígeno dentro de un tumor. Además, consecuencia de la hipertensión intersticial que suelen presentar los tejidos neoplásicos, las presiones hidrostática y oncótica entre los espacios intravascular y extravascular son casi iguales, comprometiendo aún más la llegada de nutrientes a las células tumorales.

Otto Warburg observó hace más de 80 años que, los tumores metabolizaban la glucosa por la vía de la glucólisis en lugar de la fosforilación oxidativa incluso en presencia de una tensión de oxígeno normal, este fenómeno se denominó glicolisis aerobia y hoy en día se conoce como “efecto Warburg”. Esta glicólisis es, aproximadamente, 18 veces menos eficaz que la fosforilación oxidativa en la producción de ATP, los elevados requisitos energéticos que tienen las células tumorales (además de ATP), unido a la deficiente llegada de nutrientes en determinadas zonas llevaría a la célula a buscar alternativas a esta carencia y la glicólisis sería la solución porque, en ella una parte de los intermediarios del metabolismo de la glucosa son empleados en la síntesis de diversos precursores como acetil-CoA, aminoácidos no esenciales y nucleótidos.

El metabolismo glucídico alterado en los tumores provoca excesiva producción de ácido láctico, que es bombeado en forma de lactato junto con los protones fuera del citoplasma de la célula tumoral provocando la acidificación de los tejidos que rodean al tumor (acidosis extracelular) manteniendo un pH_i neutro o alcalino (alcalosis intracelular). Este microambiente tumoral ácido e hipoxico podrían favorecer la selección de células capaces de sobrevivir en estas condiciones desfavorables y contribuir a la progresión desde un crecimiento benigno a uno maligno⁽³⁶⁾.

La alteración del metabolismo glucídico y la hipoxia son las principales características

comunes del microambiente tumoral por ello, las células neoplásicas poseen mecanismos enzimáticos reguladores del flujo de glucosa necesario para su supervivencia y crecimiento en las condiciones del medio externo en las que se encuentren, independientemente de la cantidad de sustrato presente, de la concentración de quimioterápicos o de las fase del ciclo celular en el que se encuentren.

Este flujo de glucosa en las células tumorales que, favorece el crecimiento y regulación de la señalización hacia la proliferación neoplásica está controlado por transportadores de membrana de naturaleza protéica (GLUT), en particular algunas isoterms especializadas. Así pues la sobreexpresión de éstos transportadores (sobre todo las isoformas GLUT1 y GLUT5), en las membranas de células tumorales, se ha visto relacionada con el aumento de presencia de otros elementos implicados en el mantenimiento de la alteración del pHi/pHe en el microambiente tumoral como pueden ser los transportadores de monocarboxilato MCT1 y MCT4 y la Anhidrasa Carbónica (AC) IX, posiblemente debido al acumulo de ácido láctico extracelular.⁽³⁷⁾

De entre ellos, destacamos el MCT1, presente en la membrana basolateral de las células, como uno de los que mayor papel fisiológico tiene, ya que, facilita la entrada de ácido láctico a la célula o contribuye a su salida en dependencia del estado metabólico y de las necesidades de éstas. Este ácido láctico producido durante la glicólisis unido al transportador MCT sale al medio extracelular, contribuyendo así a reducir el pH del medio intracelular en los períodos de repercusión o reoxigenación siguiente a una isquemia o hipoxia⁽³⁸⁾.

Como se ha visto en diferentes estudios, las células tumorales utilizan la vía de la glicólisis como fuente de energía metabólica y, del mismo modo se ha comprobado que expresan en su membrana elevado numero de transportadores para mantener este microambiente tumoral acidificado, entre los que encontramos también MCT⁽³⁸⁾.

La acidificación extracelular ha mostrado ser importante en la resistencia a la quimioterapia, proliferación y comportamiento metastásico de los tumores^(39,40). De hecho, la acidez tumoral contribuye a la agresividad de las células tumorales, provocando un incremento en al tasa de mutaciones y contribuyendo a la selección de células con defectos genéticos adicionales⁽⁴¹⁾.

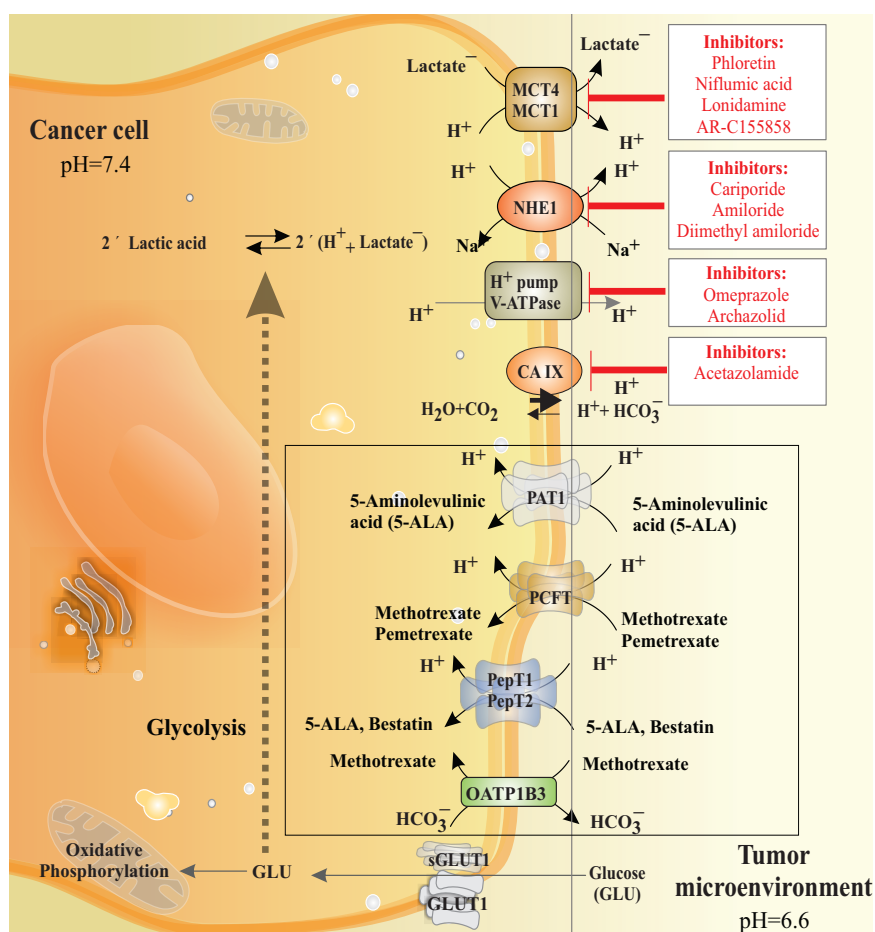


Figura 2. Principales transportadores de membrana implicados en el mantenimiento del desbalance pHe/PHi de las células tumorales y su papel en el transporte de los fármacos quimioterápicos. La glucosa es internalizada por los transportadores GLUT1 principalmente y, una vez en el citoplasma celular, mediante glicólisis, se transforma en Ácido Láctico acidificando el medio intracelular. Este ácido láctico es transportado hacia el exterior celular mediante transportadores Na⁺/H⁺ (NHE1), transportadores monocarboxilato (MCT1 y 4), bombas de protones vacuolares (V-ATPasa) y anhidrasas carbónicas (AC IX) que, pueden ser inhibidos con fármacos específicos (cuadros en rojo).

FUENTE: Jaleh Barar, Yadollah Omid. *Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy*. *BiolImpacts*, 2013, 3(4), 149-162

2.1 CON SECUENCIAS DE LA ACIDEZ TUMORAL

a) Capacidad invasiva

El pH ácido del microambiente tumoral es un factor importante en la capacidad invasiva, angiogénesis y crecimiento independiente de anclaje. El pHe ácido aumenta la actividad de enzimas proteolíticas implicadas en la degeneración de la matriz extracelular e induce su secreción^(42,43). Se ha observado que este pHe ácido aumenta la capacidad invasiva^(44,45) y favorece la liberación de factores pro-angiogénicos (IL-8, VEGF), que contribuye a la formación de nuevos vasos sanguíneos que favorecerán la diseminación de las células tumorales⁽⁴⁶⁾.

b) Resistencia a quimioterapia

Los mecanismos de entrada de fármacos a las células dependen del gradiente de concentraciones y pH, así la alteración del pH puede afectar a la distribución, entrada y actividad de los fármacos en la célula tumoral.

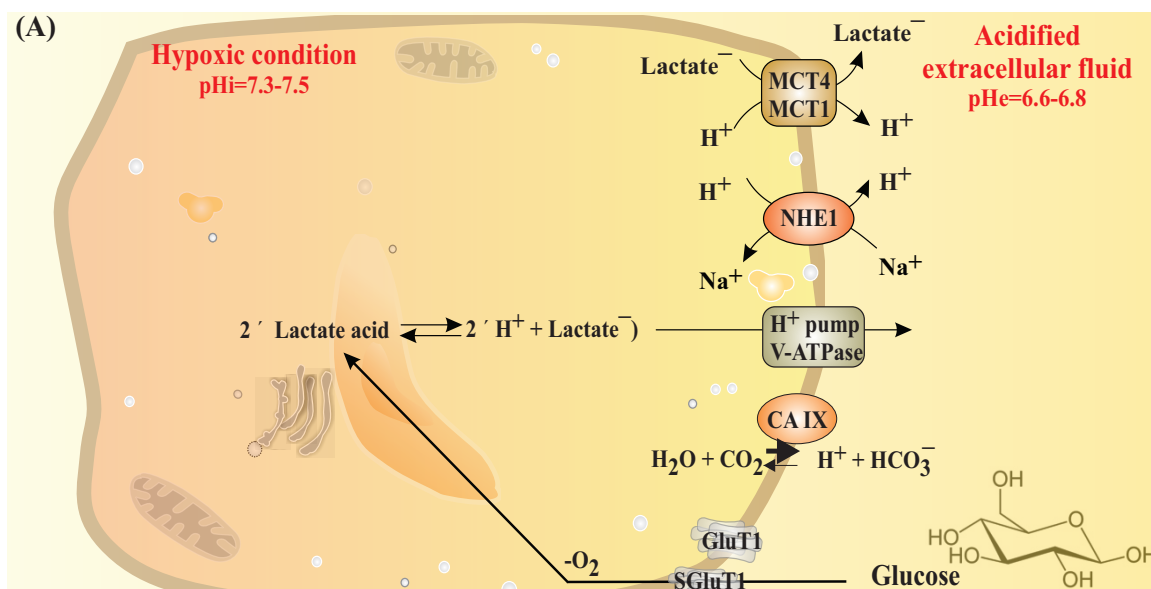
Los agentes quimioterápicos que son bases débiles (doxorubicina, vinblastina, vincristina, etc.) se encuentran protonados en el estroma tumoral ácido y en los orgánulos intracelulares ácidos (lisosomas), lo que disminuye su entrada en el citosol y provoca su secuestro en compartimentos intracelulares y su extensión.

La alcalinización del pHe ha mostrado aumentar la entrada en la célula y la actividad de fármacos citotóxicos^(47,48), así los fármacos que son ácidos débiles (camptotecina, ciclofosfamida) muestran un incremento de actividad a bajo pHe⁽⁴⁹⁾.

c) Inmunosupresión

Se desconoce el impacto que el pH tumoral puede tener sobre la respuesta inmune antitumoral pero, existe la hipótesis de que la acidosis tumoral podría afectar negativamente a la función de las células inmunes infiltradas en el tumor.

Esta idea surge consecuencia de la inmunosupresión observada en personas con acidosis y otras formas de acidemias, el pHe ácido provoca la inhibición de las células natural killer (NK) y de los linfocitos T citotóxicos⁽⁵⁰⁾.



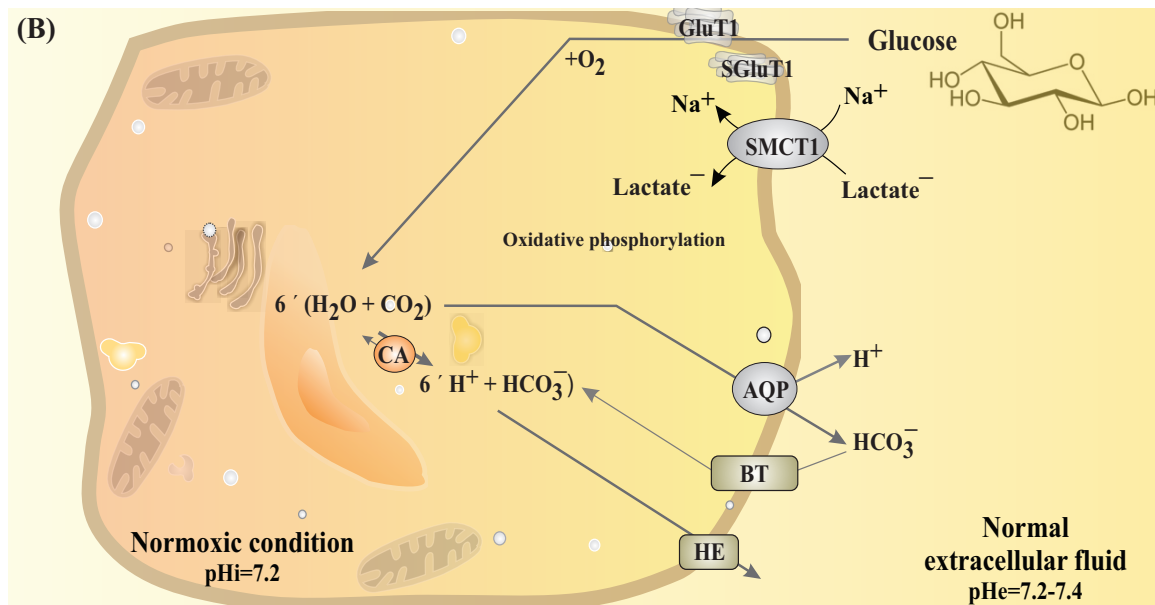


Figura 3. Regulación del pH en condiciones de hipoxia y normoxia. A) El metabolismo de la glucosa en condiciones de hipoxia produce ácido láctico y desbalance del pHe/pHi en las células tumorales. B) En condiciones de normoxia se produce el metabolismo de la glucosa mediante fosforilación oxidativa, donde el ácido láctico es introducido en la célula mediante el transportador MCT1 para ser consumido como sustrato.

FUENTE: Jaleh Barar, Yadollah Omid. *Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy*. *BiolImpacts*, 2013, 3(4), 149-162

2.2 ACIDIFICACIÓN TUMORAL COMO DIANA TERAPÉUTICA

Los principales mecanismos reguladores del pHi en las células tumorales son los intercambiadores Na⁺/H⁺, (NHE), las bombas de protones vacuolares (V-ATPasa), las anhidrasas carbónicas (AC) y los transportadores monocarboxilato (MCT)⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

a) NHE1

Intercambiador de Na⁺/H⁺ presente de forma ubicua en las membranas celulares de los mamíferos, existen 5 isoformas (NHE1-NHE5) caracterizadas por presentar diferente respuesta y sensibilidad a la carga ácida del medio extracelular⁽⁵⁴⁾

b) V-ATPasas

Enzimas multiméricas que, parecen jugar un papel clave en el control del pHi tumoral y en el desarrollo y progresión tumoral, son bombas de protones dependientes de ATP ubicuamente expresadas en células humanas, con preferencia en la membrana de compartimentos intracelulares cuyo pH es ácido (lisosomas, endosomas, vesículas secretoras, osteoclastos y células del túbulo distal del riñón) y donde, se encargan de regular su pH⁽⁵⁵⁾. Se encuentran sobreexpresadas en muchos tumores humanos⁽⁵⁶⁾, en

especial en los que presentan multirresistencia a fármacos⁵⁷⁽⁶⁶⁾. Los niveles de expresión elevados y la localización en la membrana plasmática se relacionan con un mayor potencial metastásico⁽⁵⁸⁾.

c) *MCT1 y MCT4*

Transportadores monocarboxilato que catalizan mediante unión a protones el paso de moléculas ácidas a través de la membrana plasmática. Las isoformas 1-4 son especialmente importantes por su localización subcelular y por su rápida acción, en determinados tejidos con necesidades metabólicas especiales, como puede ser el transporte del exceso de ácido láctico producido en las células tumorales⁽⁵⁹⁾

Dado que la acidificación del estoma tumoral contribuye de manera importante en la agresividad del tumor, la resistencia a los tratamientos e incluso en la evasión de la respuesta inmune, el restablecimiento del pHe tumoral es una potencial diana terapéutica en el tratamiento de los tumores.

Los experimentos realizados hasta ahora indican que la alcalinización del estroma tumoral tiene efectos beneficiosos en el tratamiento de la enfermedad. Así, la acidificación del pH_i disminuye la eficiencia de la glucólisis y por sí sola tiene un efecto antiproliferativo y proapoptótico⁽⁴¹⁾.

3. IBP COMO FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

La alteración del gradiente de pH_i/pH_e es una característica de las células neoplásicas con gran impacto en el metabolismo energético de la célula y ésta implicado en la transformación, progresión y diseminación neoplásica de diferentes extirpes celulares.

La reversión de esta alteración del gradiente ácido/base del medio intersticial e intracelular podría abrir nuevos caminos la terapéutica en cualquier tipo de tumor independientemente de su extirpe celular, del tejido de origen o de las causas genéticas.

Estudiar este fenómeno y el papel de los diferentes transportadores de protones así como su situación en la transformación neoplásicas de EB a ACE parece de gran relevancia, primero porque su modulación farmacológica podría formar parte de una nueva vía de prevención y tratamiento del ACE y segundo, por la posibilidad de usar fármacos conocidos y empleados en la práctica clínica habitual, de los cuales conocemos su seguridad y posibles efectos adversos.

Por una parte, la presencia de una lesión preneoplásica (EB) puede servir para instaurar un tratamiento de quimioprevención secundaria en pacientes que cumplan las condiciones y, por otra, el desarrollo de terapias efectivas es también prioridad, para frenar el crecimiento y diseminación tumoral en casos en los que ya esté instaurado el tumor.

Existe una característica común en todas las células tumorales, independientemente de su tipología u origen genético, y es que todos los tumores muestran una alteración de la homeostasis del ion hidrógeno H^+ , lo que se traduce en una inversión del gradiente del ion, de modo que en las células tumorales encontramos pH_i aumentado, ligeramente alcalino (7,12-7,7; normal 6,99-7,01) y pH_e disminuido, acidificado (6,2-6,9; normal 7,3-7,4). Esta inversión es considerada muestra de identidad tumoral provocando, una alteración del balance termodinámico y del metabolismo energético y, mostrando su influencia también en la transformación y progresión del proceso neoplásico.

Así la inducción y/o mantenimiento de niveles de pH_i alcalinos produce un aumento de la proliferación y crecimiento tumoral independiente de factores de crecimiento o sustrato y, la consiguiente acidosis del medio extracelular favorece la supervivencia de la célula tumoral, aumentando su resistencia frente a algunos fármacos.

Las células tumorales consiguen mantener este gradiente inverso de pH gracias a su capacidad para secretar protones H^+ y, mediante la acción de una serie de transportadores unidos a la membrana NHE-1, $H^+VATPasas$, CA IX y XII, MCT1 y 4 que consiguen evitar la acidificación del medio intracelular que conduciría a la muerte por apoptosis⁽⁴²⁾.

Las células que mantienen los mayores gradientes de pH en los compartimentos intracelulares acumulan mayor cantidad de fármacos y poseen una mayor quimiorresis-

tencia, por este motivo la inhibición de la V-ATPasa sensibiliza a las células a la acción de la quimioterapia⁽⁴³⁾.

Los IBP son capaces de inhibir esta bomba de manera menos selectiva que otros fármacos aunque a concentraciones superiores a las necesarias para la inhibición de la bomba gástrica. Su uso habitual en terapéutica, a nivel global hace que conozcamos datos sobre su seguridad, tolerabilidad y efectos secundarios, siendo éstos poco frecuentes y leves, incluso a dosis altas⁽⁴⁴⁾.

El potencial de los IBP como inhibidores de la H⁺VATPasa tumoral se fundamenta en el hecho de que necesitan ser protonados para transformarse en molécula activa. Se administran como pro-fármacos y, de manera análoga a lo que sucede en la cámara gástrica, podrían ser protonados y transformados en metabolito activo en el espacio extracelular (microambiente tumoral) bloqueando la H⁺VATPasa y revirtiendo el pH tumoral alterado, induciendo la muerte celular por apoptosis e inhibiendo la proliferación y diseminación de las células tumorales. Esta hipótesis ha sido confirmada por el grupo de Fais, utilizando IBP a dosis altas en un modelo de xenoinjertos de melanoma en ratón nude⁽⁴⁵⁾.

El número de estudios sobre el uso antineoplásico de los inhibidores de transportadores de protones es escaso pero, ha aumentado en los últimos años en todo el mundo (Jaques Pouysségur, Francia; Stefano Fais y Stephan Reshkin en Italia; Robert Gatenby en EEUU; Angelo de Milito en Suecia; Salvador Hardinguey en España y otros), porque demuestran que la inhibición farmacológica de las bombas de protones tiene un potente efecto antineoplásico sobre diversas extirpes tumorales^(39,42,45-51).

En estudios *in vitro* de distintos tumores sólidos y hematológico se ha visto que poseen efecto antiproliferativo, aumentan la apoptosis y disminuyen la capacidad invasiva de los tumores sin afectar a las células sanas normales y, cuando son administrados en conjunto con quimioterapia convencional aumentan la entrada de fármacos a la célula tumoral elevando la eficacia antineoplásica de éstos.

Los estudios *in vivo* realizados en modelos animales tratados con IBP muestra un aumento de la supervivencia global, disminución del tamaño y crecimiento tumoral, provocando escasos efectos secundarios sobre el animal, incluso a dosis elevadas.

Estos estudios también muestran que el protocolo de administración de los IBP podría ser importante, siendo la pauta de administración mas adecuada a días no consecutivos debido a que, los efectos de la regulación del pH *in vivo* a nivel tumoral tuvieron una duración máxima de 48 horas, regresando a niveles basales después; y que necesitan un pH ácido para activarse al ser administrados como pro-fármacos^(47,53,54).

Dado estos resultados sobre el efecto antineoplásico de los IBP en diversos tipos de tumores, tanto *in vitro* como *in vivo*, sugieren que su administración como quimiosensibilizadores junto con quimioterapia convencional podría tener un enfoque

innovador y efectivo en el tratamiento del cáncer, y podría mejorar la efectividad de estas terapias ya que, la combinación de ambos mejora la disponibilidad del fármaco antitumoral.

Además de esta alteración del gradiente, las células tumorales presentan alteraciones en su metabolismo glucídico, caracterizada por el aumento de la captación de glucosa mediante el aumento de expresión de moléculas transportadoras de glucosa (GLUT), no insulinodependientes, así en las células neoplásicas la captación de glucosa se rige en función de las concentraciones extracelulares, (esto ya se usa en clínica para el diagnóstico precoz de tumores y para evaluar la respuesta tumoral al tratamiento mediante PET asociado a un análogo de glucosa ^{18}FDG). Y, por la preferencia de las células neoplásicas para metabolizar la glucosa vía glicolítica (incluso en presencia de O_2), Glicólisis Aerobia o Efecto Warburg, consecuencia del cual, se produce en la célula gran cantidad de ácido láctico, expulsado al medio extracelular a través de los transportadores de membrana, acidificando más el medio externo tumoral.

Existen diversos estudios que avalan la hipótesis de que la alteración primaria del cáncer sería la alteración del pH intracelular (alcalosis celular) inducida por diversos estímulos, desde oncogenes a factores crecimiento, virus u hormonas^(55,56). Los resultados de éstos estudios avalan esta hipótesis, demostrando que la alcalosis celular no sólo activa la glicólisis sino que también dificulta la fosforilación oxidativa y la entrada de piruvato en el ciclo de Krebs. En cualquier caso, sea cual sea el origen de esta alteración metabólica, las alteraciones del metabolismo glucídico que presentan las células tumorales podrían ser utilizadas para el diagnóstico (como hemos comentado) y para fines terapéuticos. A *nivel experimental* se ha demostrado que la administración de glucosa por vía intravenosa disminuye el pH a nivel tumoral sin afectar el pH a nivel sistémico. Esta acidosis selectiva a nivel tumoral inducida por hiperglucemia podría aplicarse para aumentar la citotoxicidad de drogas inmunoterápicas (las que requieren pH ácido para su activación) o para aumentar el efecto de la hipertermia.

Otro de los transportadores que podría ser importante en la progresión neoplásica y metastásica, es el NHE-1, expresado de forma mayoritaria en los tumores, donde tiene importante función en la regulación del pH, transformación celular, proliferación, motilidad, migración, invasión, activación del proceso metastásico y resistencia a la quimioterapia. Se ha demostrado que su inhibición produce retraso del crecimiento celular, acidificación del medio intracelular y apoptosis selectiva.

HIPÓTESIS

La inhibición del transporte de protones en células de adenocarcinoma de esófago induce un cambio en el pH intra/extracelular que desencadena la inhibición del crecimiento tumoral así como la muerte celular programada por apoptosis.

OBJETIVOS

El objetivo concreto de este estudio ha sido estudiar el efecto que la inhibición farmacológica de diferentes transportadores de protones, en concreto la bomba de protones V-H⁺ATPasa y el transportador MCT1, ejerce sobre los fenómenos de proliferación y apoptosis en un línea celular de adenocarcinoma de esófago.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES / MANTENIMIENTO

Para llevar a cabo este estudio, hemos utilizado una línea de células de ACE humano, línea OE33, que se obtuvo de la European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK), (ECACC 96070808).

La línea celular OE33, también conocida como JROECL33, fue establecida a partir de un adenocarcinoma de esófago distal (originado sobre un Esófago de Barrett) de una mujer caucásica de 73 años. Dicho tumor correspondió a un estadio IIA (UICC) y en el análisis histológico mostró escasa diferenciación.

Las células OE33 expresan de forma constitutiva antígenos HLA-A, -B and -C (MHC clase I) así como moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1).

La expresión de HLA-DR (MHC clase II) puede ser inducida mediante tratamiento con interferon-gamma. Las células expresan citoqueratinas y se ha demostrado que son tumorigénicas en ratón atímico.⁽⁵⁹⁾

En estudios previos realizados por el grupo de investigación de Patología Digestiva, se comprobó mediante microscopía confocal y citometría de flujo, que esta línea celular expresa la bomba de protones V-H⁺ATPasa a nivel citoplasmático pero también a nivel de membrana plasmática (datos no publicados). Además, estas células en condiciones normales de cultivo muestran un valor de pH intracelular de 7.8, lo que concuerda con lo descrito en la bibliografía en células tumorales.

Las células se mantuvieron en incubador a 37°C en una atmósfera saturada de humedad y con un 5% de CO₂. Se cultivaron en frascos T75 con medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, Madrid, España) suplementado con 10% de FBS y 1% de solución antibiótica-antimicótica (10⁴U/mL penicilina, 10⁴µg/mL estreptomicina, 25µg/mL anfotericina B) (Life Technologies) de acuerdo a las recomendaciones de la ECACC.

2. MÉTODOS DE CULTIVO

2.1. Descongelación de Células

Para llevar a cabo los experimentos utilizamos una alícuota de células de la línea OE33 del stock que el grupo de Patología Digestiva tiene en los laboratorios del CIBA congeladas en tanque de nitrógeno líquido. La criopreservación celular implica mantener a las células en un medio el cual contiene un agente criopreservador como dimetilsulfóxido (DMSO) a -80 °C o -196 °C, lo cual disminuye las funciones vitales de las células y las mantiene en condiciones de vida suspendida por tiempos prolongados.. El medio que utilizamos para la congelación es suero bovino fetal 90% + 10 % DMSO.

Para descongelar las células, sumergimos el criovial en un baño de incubación a 37°C,

con el objeto de llevar a cabo la descongelación de manera rápida y minimizar así el tiempo que las células están expuestas al DMSO, ya que éste puede resultar tóxico para las células. Tan pronto como observamos que la suspensión celular se ha descongelado, pasamos esta suspensión a un tubo Falcon de 15 mL que contiene 9 mL de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal. Centrifugamos a 1300 rpm durante 5 minutos, eliminamos el sobrenadante que contiene el DMSO y finalmente resuspendemos el pellet celular en 10 mL de medio de cultivo con 10% SBF y sembramos en un frasco de cultivo T75.

2.2 Subcultivo Celular.

Una vez que las células proliferan activamente y alcanzan una confluencia del 70-80%, son tratadas con una solución de tripsina suplementada con EDTA al 0.05%, para despegar las células del sustrato donde están adheridas y separarlas entre sí para disgregarlas. Para separar las células de cultivo, aspiramos el medio con pipeta Pasteur de vidrio estéril, lavamos con DPBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (solución de sales para eliminar restos de FBS e iones del medio de cultivo antes de la disociación celular), posteriormente añadimos la solución de tripsina-EDTA (serina-proteasa empleada para disociar del sustrato los cultivos adherentes por su capacidad de cortar enlaces peptídicos entre aminoácidos básicos y puesto que la adhesión celular depende de iones como Ca^{2+} , contiene EDTA, quelante de iones divalentes) e incubamos 1 min, a temperatura ambiente. A continuación, aspiramos la tripsina e introducimos el Frasco en la estufa a 37°C (durante 6 minutos en las células OE33 y 4 minutos en la línea SKGT-4). Posteriormente resuspendemos las células en medio de cultivo con 10% FBS y efectuamos el recuento mediante una cámara de Neubauer. Una vez levantadas las células, las recogemos en medio de cultivo que distribuiremos a otros frascos de cultivo con objeto de tener siempre células disponibles, o bien sembraremos un número específico de células para realizar los experimentos.

2.3 Adición de tratamiento a los cultivos.

En este estudio hemos utilizado las siguientes drogas:

a) *Esomeprazol sódico (Abcam, España)*

Es un fármaco perteneciente a la familia denominada inhibidores de la bomba de protones (IBP's). Estos son los fármacos más potentes y más utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de las enfermedades en las que está implicada un exceso de secreción ácida gástrica. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición selectiva e irreversible de la H^+/K^+ -ATPasa de la célula parietal gástrica. El ESOM (S-Omeprazol) es el primer IBP desarrollado como un isómero óptico. Dado que se ha demostrado que es capaz de inhibir también la H^+V -ATPasa, en este estudio lo utilizamos con ese fin. Las concentraciones

testadas han sido: 0, 10, 50, 100 y 200 μ M. Este compuesto es soluble en medio acuoso, por lo que se disuelve en el medio de cultivo.

b) AZD3965 (Medchemexpress LLC, USA)

Inhibidor selectivo del transportador de monocarboxilatos 1 (MCT1). En algunas líneas celulares, la inhibición del transporte de lactato induce un efecto citotóxico. Así, se ha demostrado en células de linfoma que tanto el transporte de lactato como el crecimiento celular son inhibidos de forma potente por el AZD3965.

Se ha visto que el bloqueo del transporte de lactato in vitro produce además una rápida inhibición de la captación de glucosa en la línea celular de linfoma de Burkitt Raji. In vivo, se ha demostrado que el AZD3965 se tolera bien e induce una acumulación de lactato de forma dependiente del tiempo y de la dosis, suprime el crecimiento tumoral y potencia el efecto de drogas quimioterápicas como Rituxan, Doxorubicina y Bendamustina en el modelo de linfoma Raji. En este estudio hemos testado 2 concentraciones diferentes: 10 y 100 nM. Este compuesto se disuelve en DMSO

c) Solución de D-(+)-Glucosa (Sigma Aldrich, Madrid, España) o

Los compuestos anteriormente descritos los hemos utilizado en dos condiciones experimentales diferentes, con y sin sobrecarga de glucosa en el medio. Con la sobrecarga de glucosa pretendemos inducir mayor producción de ácido láctico y por tanto provocar mayor acidificación a nivel celular. Para ello añadimos solución de Glucosa para alcanzar una concentración final en el medio de cultivo de 30 mM, lo que equivaldría a una concentración de glucosa en sangre de 540 mg/dL. El medio RPMI 1740 contiene Glucosa en concentración 11 mM.

3. DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR MCT1 MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA.

La expresión del transportador MCT1 se evaluó en la línea celular OE33 mediante inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la secuencia de aminoácidos 191-260 del transportador MCT1 humano (sc365501, Santa Cruz Biotechnology). Para ello, se obtuvo mediante centrifugación el pellet de células correspondientes a un frasco de cultivo T75 en un estado de confluencia de aproximadamente 80%, y se procedió a su fijación en paraformaldehído al 4% durante 24 horas para ser posteriormente incluido en parafina. Para la tinción inmunohistoquímica, se utilizaron cortes de 3 micras. La recuperación antigénica se realizó mediante el sistema PTLINK de DAKO a 95°C durante 20 minutos. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario a dilución 1:150 durante 30 minutos y posteriormente se procedió al revelado de

las mismas con el sistema ENVISIONFLEX de DAKO. Como control positivo se incluyó una muestra de carcinoma de colon siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTATO INTRACELULAR

La concentración de lactato en las células OE33 se determinó utilizando un kit comercial (Lactate assay kit, Sigma Adrich). Con este kit, la concentración de lactato se determina mediante un ensayo enzimático colorimétrico, en el que la concentración de lactato es proporcional al color desarrollado ($\lambda=570$ nm). Los valores de lactato de las muestras problema se obtuvieron a partir de la recta de calibración que se obtuvo con los estándares de lactato incluidos en el kit.

Para ello, las células una vez sometidas a los diferentes tratamientos se despegaron de la placa de cultivo con tripsina-EDTA y se centrifugaron a 1500 rpm 10 minutos. El pellet celular obtenido se sonicó en 4 volúmenes de búffer de ensayo suministrado en el kit. Tras centrifugar el lisado celular, se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta la realización del análisis. Con objeto de evitar la degradación de lactato por la LDH presente en las muestras, antes de realizar la determinación, las muestras se desproteinizaron utilizando un filtro que retiene aquellas proteínas con peso molecular superior a 10 kDa (10 KDa cut-off spin filter, AMICON ULTRA-15 10K CENTRIFUGAL DEVICE). Los valores de lactato se normalizaron con la concentración de proteína presente en el sobrenadante del lisado celular. La cuantificación de proteína se llevó a cabo mediante técnica colorimétrica utilizando el método del Ácido Bicinchonínico (BCA). Este método depende principalmente de que, en un medio alcalino, los enlaces peptídicos de las proteínas reducen Cu^{++} . Los iones Cu^{+} producidos, se unen a dos moléculas de BCA y al hacerlo, les cambian la estructura electrónica de tal manera que absorbe luz a 562 nm y aparecen púrpura. En las condiciones de la reacción, la absorción del compuesto es proporcional a la concentración de proteína presente. Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para construir la recta patrón.

5. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS

La muerte celular programada es un proceso genéticamente regulado por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos. En este estudio, determinamos la apoptosis de forma cuantitativa mediante citometría de flujo, realizando el marcaje celular con anexina V conjugada con FITC (ANXV) y yoduro de propidio (IP) (Annexin V-FITC apoptosis detection kit, Immunostep, Salamanca, España). La anexina V es una proteína con capacidad para unirse a los residuos de fosfatidilserina, que en condiciones normales se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática pero que al comenzar el

proceso apoptótico quedan expuestos en la cara externa de la membrana, por lo que entonces se puede unir la ANXV con alta afinidad. El IP es una molécula fluorescente que se intercala entre los ácidos nucleicos. Dado que no es capaz de atravesar la membrana plasmática, sólo accede al núcleo cuando la membrana se encuentra seriamente comprometida. Usando de forma simultánea ANXV y IP podemos diferenciar entre células viables (ANXV- y IP-), células apoptóticas tempranas (ANXV+ PI-, ya que todavía mantienen íntegra la membrana plasmática por lo que el IP no puede acceder al interior celular), células apoptóticas tardías y necróticas (ANXV+ y IP+) y células necróticas (ANXV- PI+).

En nuestro estudio consideramos apoptóticas las células que marcaban sólo ANXV y las que eran positivas tanto para ANXV como para IP.

Para evaluar los efectos de los diferentes tratamientos sobre la apoptosis de las células OE33, las células fueron sembradas en placas de 25 cm² dejándolas crecer un mínimo de 48h, hasta que alcanzaron aproximadamente 50-60% de confluencia. Posteriormente cambiamos el medio y añadimos los diferentes tratamientos o bien el solvente utilizado para resuspender las drogas a la misma concentración en el caso de los controles, e incubamos durante 48h a 37°C y 5% de CO₂. Levantamos el cultivo, conservando tanto el pellet como el sobrenadante (ya que contiene una cantidad importante de células muertas) y lavamos con PBS.

Resuspendemos a una concentración de 10⁶ cels/mL en PBS e incubamos con la solución de ANXV y IP (5µL/100µL suspensión celular) durante 15 min a temperatura ambiente en la oscuridad.

Finalmente analizaremos apoptosis mediante citometría de flujo (Facsaria, BD).

6. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

El efecto de los diferentes compuestos sobre la proliferación celular se determinó mediante citometría de flujo utilizando yoduro de propidio. Partimos de 1 millón de células, que resuspendemos en 200 µL de PBS, añadimos 1 mL de etanol al 70% frío (-20°C) agitando suavemente para fijar las células. Una vez fijadas, las células se guardan al menos 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo se centrifugan, se elimina el etanol, y el pellet se resuspende en 1 mL de buffer de marcaje (IP) con el que se incuba 30 min a temperatura ambiente. La suspensión celular se pasa por el citómetro hasta que por lo menos haya 10000 células adquiridas en el ciclo (sin contar debris y agregados). La adquisición debe hacerse a la menor velocidad posible para que las fases del ciclo queden lo mejor definidas posible. El buffer de lisis consta de 940 µL de PBS, 50µL de solución 1mg/mL de yoduro de propidio (concentración final 50 µg/mL) y 10 µL de solución 10mg/mL de RNAsa (concentración final 100 µg/mL) que se utiliza para eliminar el

ARN ya que el yoduro de propicio no es específico de ADN, sino que se une a cualquier ácido nucleico.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan mediante la media \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante el test t-Student para datos pareados utilizando el software GraphPad. Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de p fueron < 0.05 .

RESULTADOS

1. Expresión del transportador selectivo de lactato MCT1 en la membrana basal de células OE33

La tinción inmunohistoquímica demostró que la línea celular OE33 expresa el transportador MCT1 como puede apreciarse en la Figura 6 (Imagen A), esta expresión se localizo preferentemente a nivel de la membrana plasmática y en menor medida a nivel del citoplasma

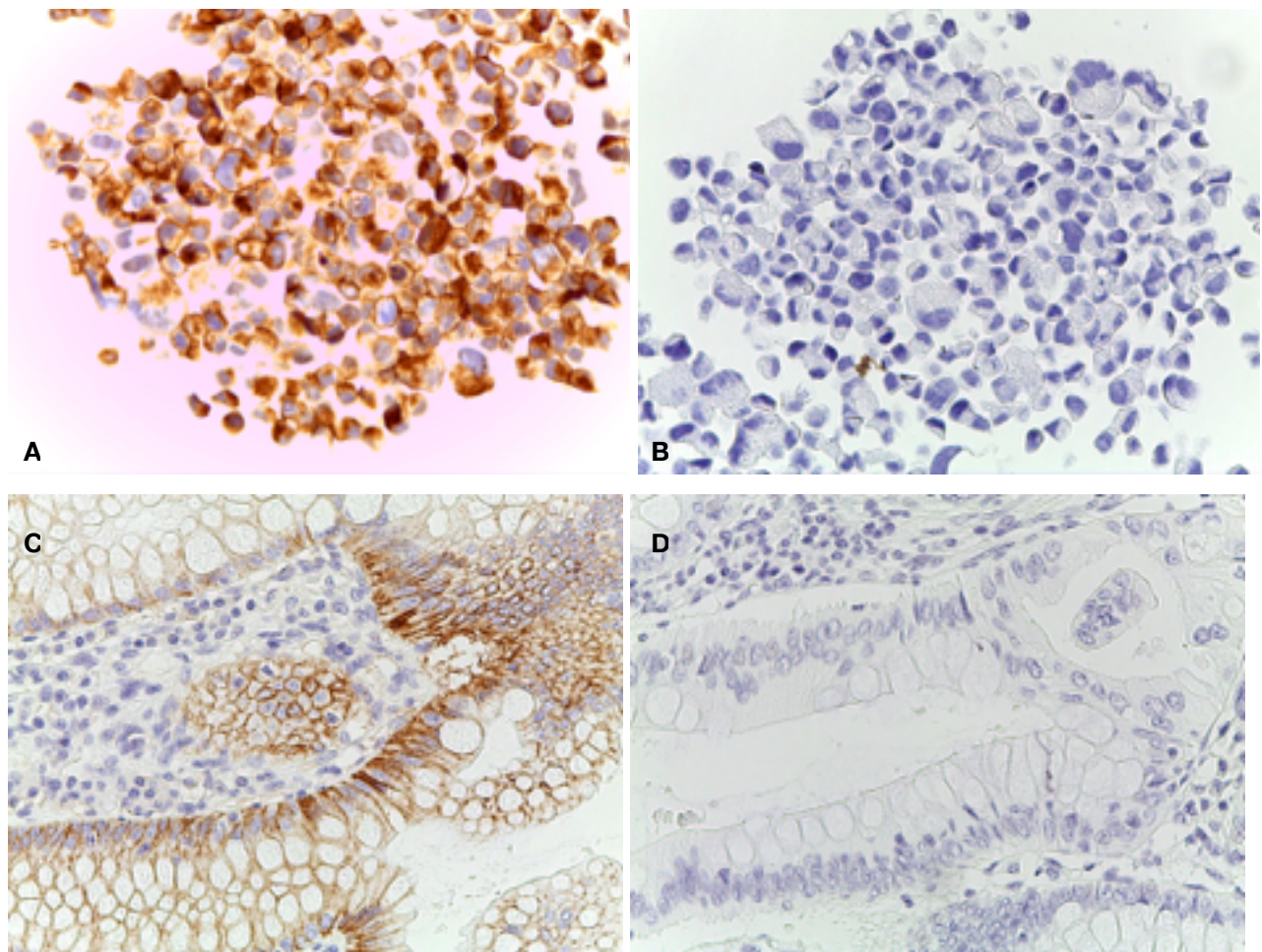


Figura 4: Microfotografías mostrando la tinción inmunohistoquímica del transportador MCT1

Imagen A) Expresión de MCT1 en la línea celular OE33. Se observa expresión localizada preferentemente a nivel de la membrana plasmática.40x'

Imagen B) control negativo de las mismas células en el que se omite la incubación con anticuerpo primario, que demuestra que la tinción observada es específica.40x'

Imagen C) Como control positivo de técnica inmunohistoquímica se incluyó un carcinoma de colon en el que se observa la expresión del transportadorMCT1.40x'.

Imagen D) corresponde al control negativo de la muestra de carcinoma de colon

2. Efecto de la concentración de Glucosa en el medio de cultivo en los niveles de lactato intracelular

Como se puede observar en la figura X, cuando se incubaron las células en el medio de cultivo con sobrecarga de glucosa (concentración final 30 mM), los niveles de lactato intracelular aumentaron respecto a los niveles de lactato que presentaban las mismas células sin la adición de glucosa al medio RPMI (concentración final de glucosa 11 mM), si bien esta diferencia no alcanzó significación estadística.

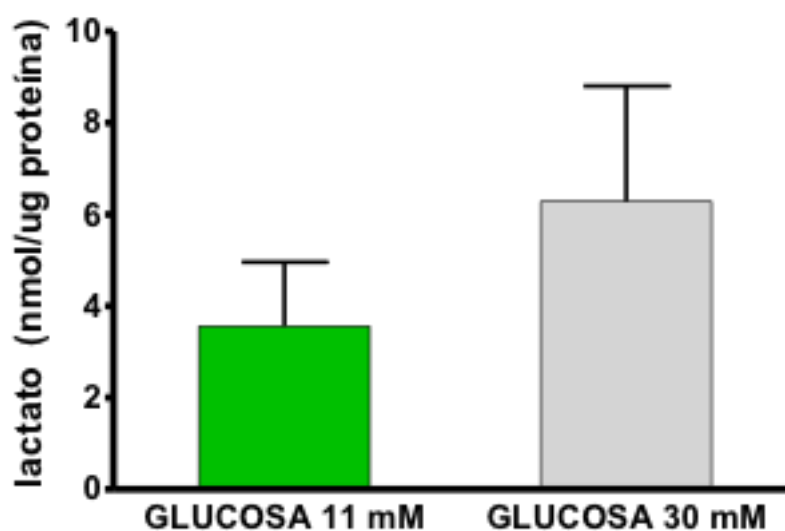


Figura 5. Concentración intracelular de lactato en las células OE33 en medio RPMI 1640 (concentración de glucosa 11 mM) y después de sobrecarga de glucosa en el medio (concentración de glucosa 30 mM). n=3

3. Efecto del tratamiento con Esomeprazol con y sin sobrecarga de glucosa en la apoptosis de las células OE33.

El efecto de la apoptosis se evaluó tras 48 horas de tratamiento mediante citometría de flujo mediante el marcaje con ANXV y IP. Consideramos apoptóticas aquellas poblaciones que se encuentren en los cuadrantes Q2 y Q4, es decir, aquellas células positivas tanto para ANXV y IP (apoptóticas tardías y necróticas) y positivas sólo para ANXV (apoptóticas tempranas). Los resultados se expresan como porcentaje (%) de células apoptóticas.

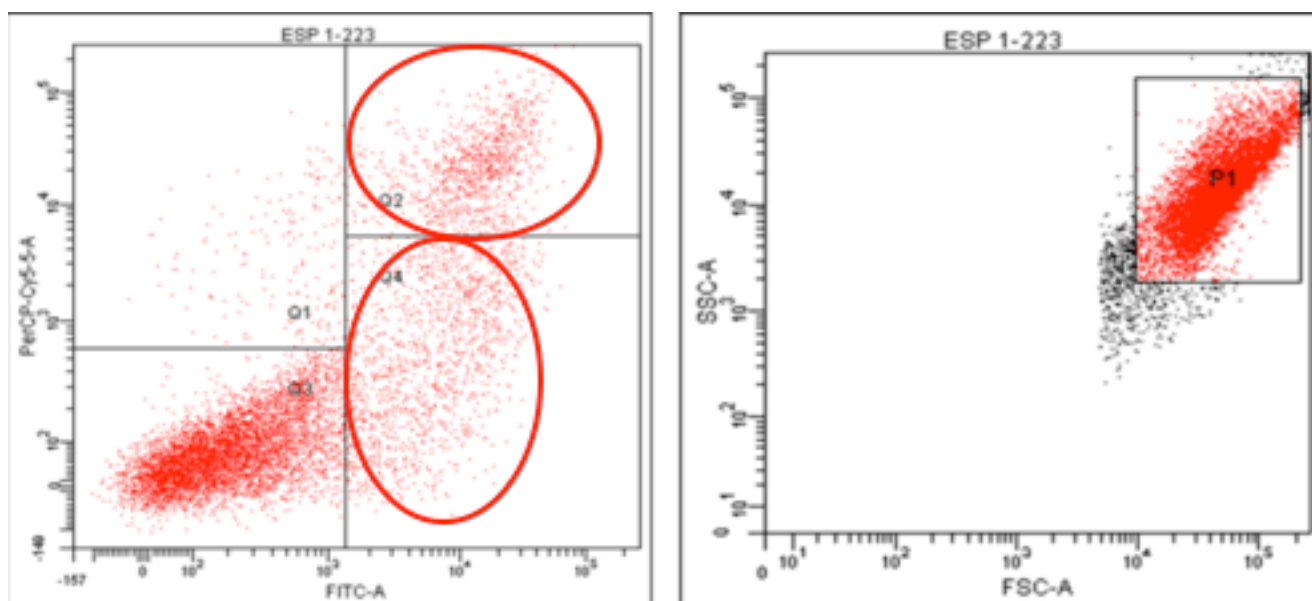


Figura 6. Ejemplo de análisis de apoptosis por citometría de flujo. Fueron consideradas células apoptóticas aquellas incluidas en los cuadrantes Q2

Como se muestra en la figura 9, la adición de Esomeprazol al medio de cultivo incrementó de manera significativa la tasa de apoptosis a una concentración de 200 μ M respecto a las células sin tratamiento.

Por otra parte, cuando además del tratamiento con Esomeprazol se sometió a las células a una sobrecarga de glucosa (concentración final en el medio de 30 mM), el aumento de la tasa de apoptosis fue mayor, incluso la combinación de la sobrecarga de glucosa junto con esomeprazol mostró diferencias significativas con respecto al control para una dosis más baja de Esomeprazol (100 μ M dosis).

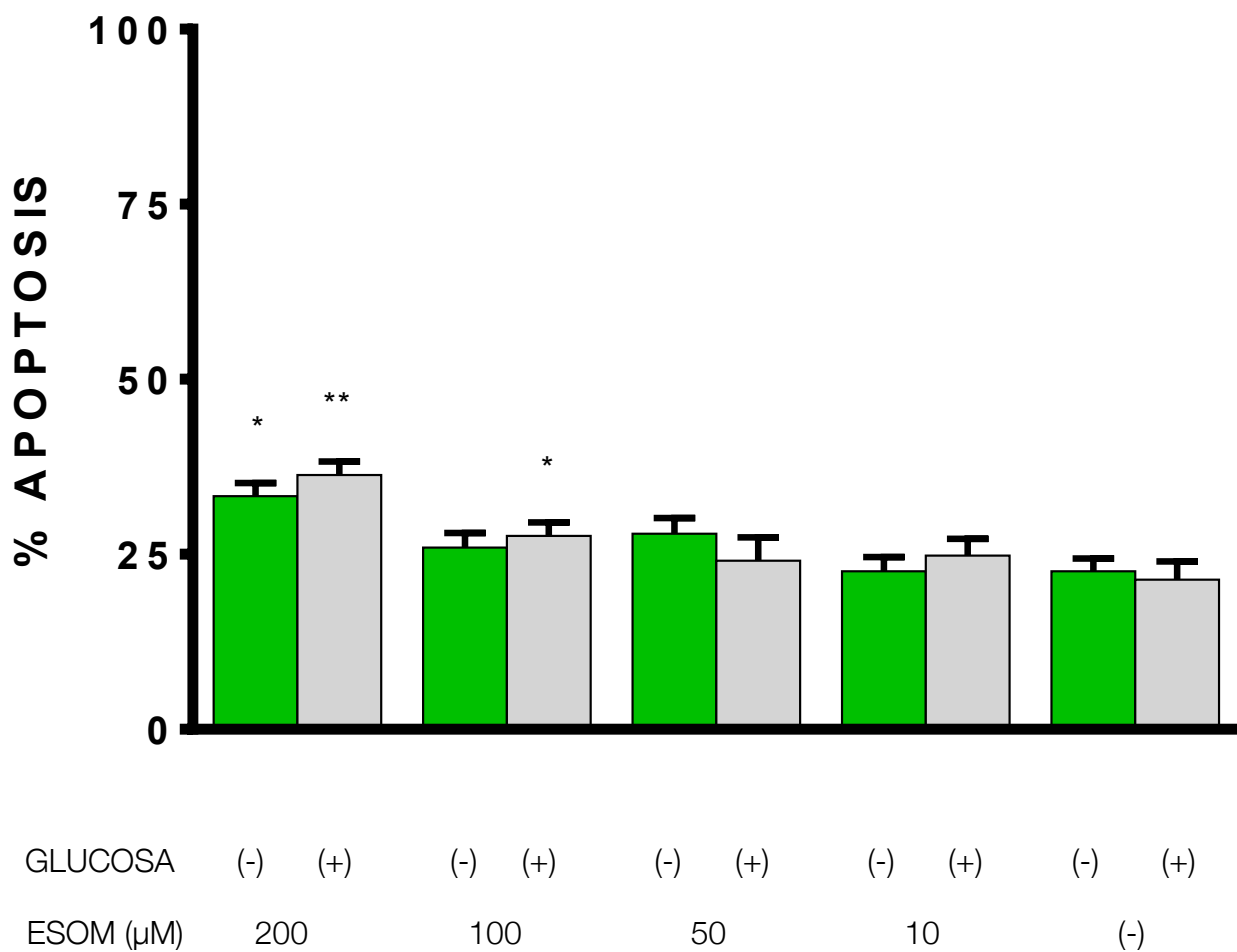


Figura 7. Efecto de Esomeprazol con/sin sobrecarga de glucosa sobre la apoptosis de células OE33. Las barras representan la media \pm error estándar. $n=4$ * $p<0.05$; ** $p<0.01$ respecto al control sin tratamiento

4. Efecto del tratamiento con Esomeprazol con y sin sobrecarga de glucosa en la proliferación de las células OE33

La proliferación celular se cuantificó mediante análisis del ciclo celular por citometría de flujo. Consideramos para ello las células que se encontraban en fase S (síntesis de ADN) y fase G2 (crecimiento). Como se puede observar en la figura X, el tratamiento con Esomeprazol inhibió de forma significativa la proliferación celular a dosis de 200 y 100 μM con respecto al control al que no se añadió esomeprazol. La adición de glucosa al medio RPMI a una concentración final de 30 mM, paradójicamente al efecto que observamos en la apoptosis, estimuló la proliferación de las células OE33, llegando incluso a revertir el efecto inhibitorio que indujo el Esomeprazol a dosis altas.

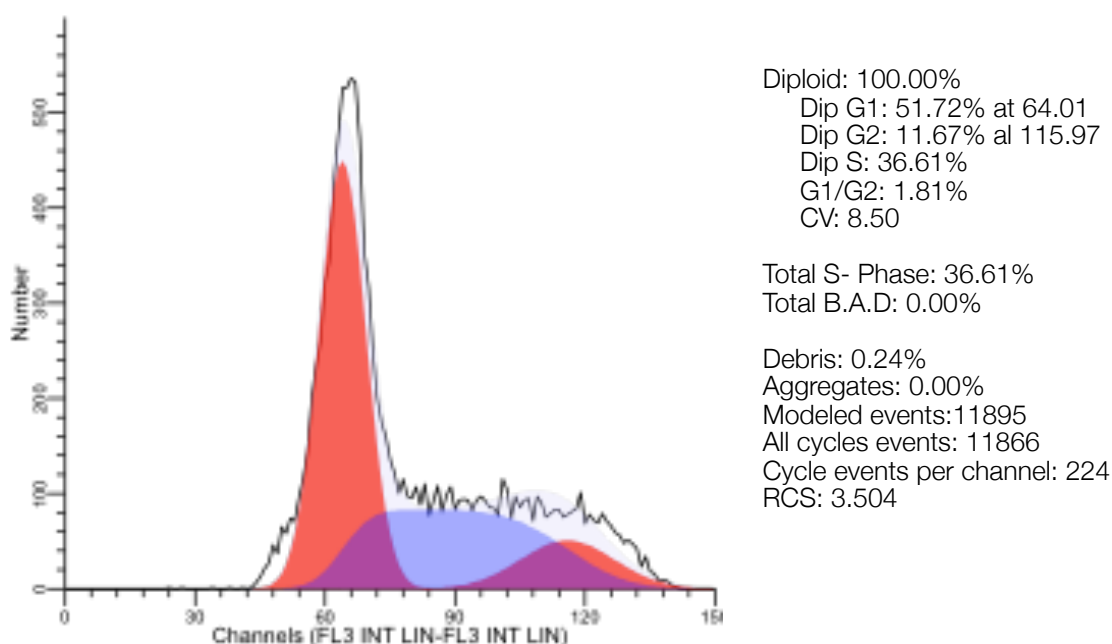


Figura 8. Imagen representativa de un experimento de ciclo celular por citometría de flujo.

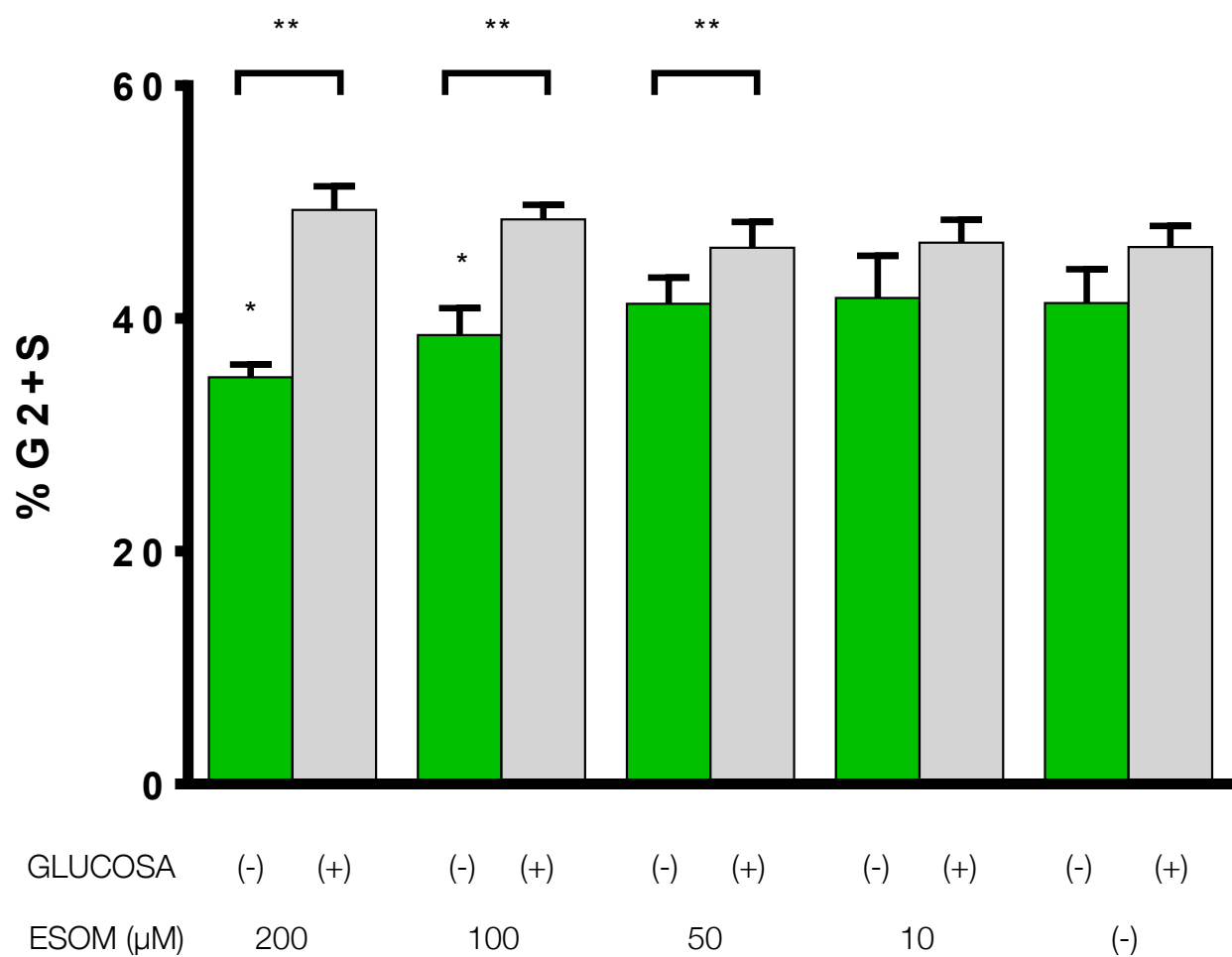
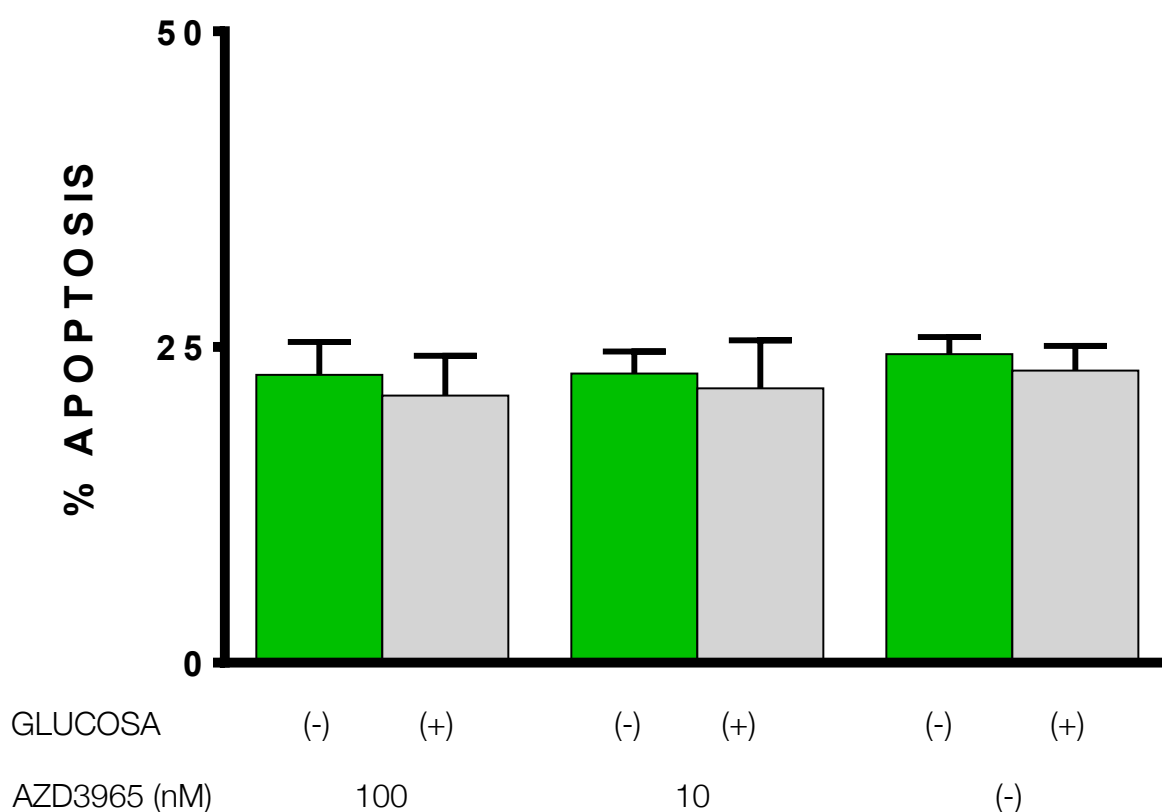


Figura 9. Efecto de Esomeprazol con/sin sobrecarga de glucosa sobre la proliferación de las células OE33. Las barras representan la media +/- error estándar. n=4 *p<0.05 células

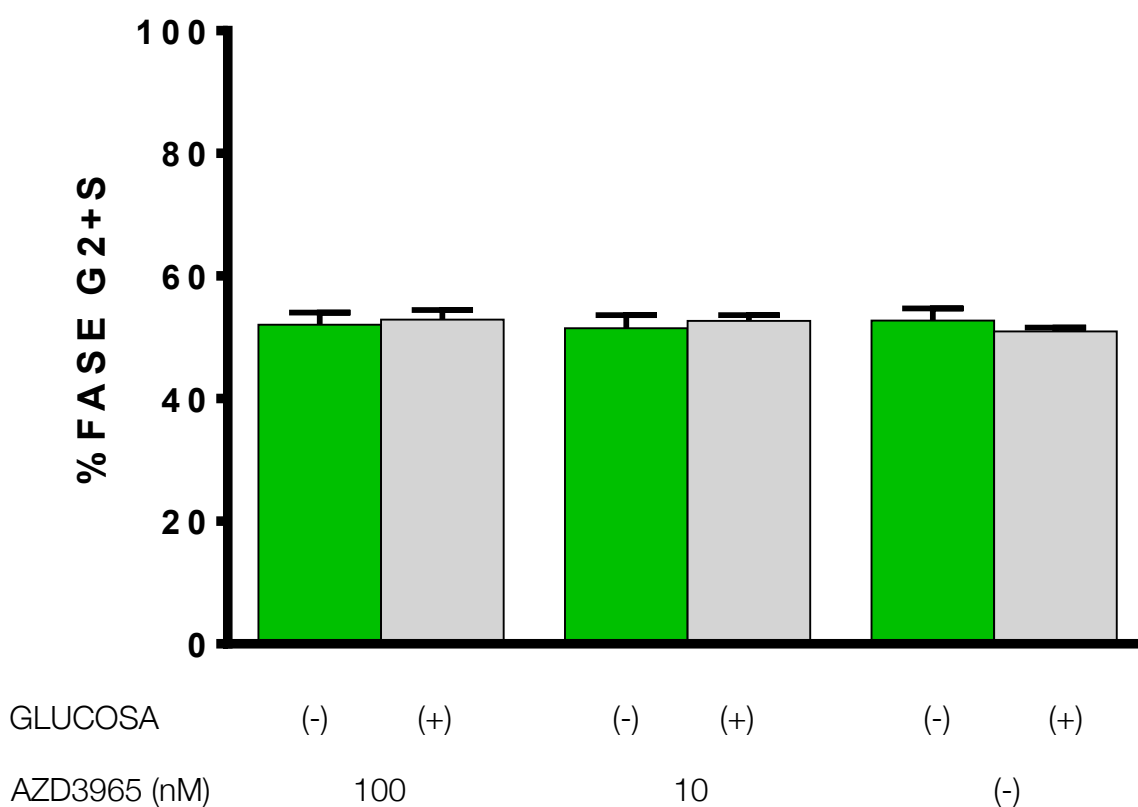
5. Efecto del tratamiento con un inhibidor selectivo del transportador MCT1 (AZD3965) en la apoptosis de las células OE33

Para bloquear el transportador MCT1 empleamos un inhibidor selectivo del mismo, el AZD3965. El tratamiento con el inhibidor de MCT1 se testó tanto en medio de cultivo normal como con sobrecarga de glucosa. Como puede observarse en la gráfica inferior, que muestra el porcentaje de células que se encuentran en fase apoptótica, la adición de AZD3965 a concentraciones de 100 y 10 nM al medio de cultivo no indujo ningún efecto significativo en la apoptosis de las células OE33 ni cuando se cultivaron en medio RPMI estándar ni tampoco cuando se sometieron a sobrecarga de glucosa (30 mM).



6. Efecto del tratamiento con un inhibidor selectivo del transportador MCT1 (AZD3965) en la proliferación de las células OE33

El tratamiento con el inhibidor selectivo del transportador MCT1 a dosis de 100 y 10 nM no produjo ningún efecto en la proliferación de las células OE33 independientemente de la concentración de glucosa presente en el medio de cultivo (11 mM o 30 mM). La gráfica inferior muestra el porcentaje de células OE33 que se encontraban en fase S o G2 tras 48 horas de tratamiento.



7. Efecto del tratamiento con el inhibidor selectivo del transportador MCT1 en

Dado que el inhibidor de MCT1 no había mostrado ningún efecto sobre la apoptosis ni sobre el ciclo celular, con objeto de dilucidar si esta ausencia de efecto era debida a una falta de inhibición del transportador por la droga a las dosis testadas, medimos la concentración de lactato intracelular tras la incubación de las células con AZD3965 con y sin sobrecarga de glucosa.

Los resultados que se muestran corresponden a un experimento, por lo que es necesario confirmarlos en nuevos experimentos pero indican que a las dosis empleadas el AZD3965 inhibe de forma efectiva el eflujo de lactato ya que las células control mostraron unos niveles de lactato de 4.51 nmol lactato/ μ g de proteína mientras que los niveles en las células tratadas con AZD3965 a concentración de 10 nM fueron de 8.93 nmol lactato/ μ g de proteína y en las células tratadas con AZD3965 a 100 nM fueron de 13.47 nmol lactato/ μ g de proteína. En las células con sobrecarga de glucosa la cantidad de lactato a nivel intracelular era de 8.24 nmol lactato/ μ g proteína, y tras tratamiento con el inhibidor MCT1 de 12.1 y 9.9 nmol lactato/ μ g de proteína a las dosis de 10 y 100 nM respectivamente

DISCUSIÓN

En este estudio hemos evaluado el efecto que la inhibición de dos transportadores de protones, la bomba V-H⁺ATPasa y el transportador de monocarboxilato MCT1 produce en la proliferación y apoptosis de células de adenocarcinoma de esófago humano. Además hemos analizado si este efecto se ve influenciado por la concentración de glucosa en el medio de cultivo. Para tal propósito, las células se cultivaron en dos condiciones: con el medio de cultivo RPMI1640 que contiene glucosa en una concentración 11 mM, o con el mismo medio pero suplementado con glucosa hasta alcanzar una concentración de 30 mM. Para inhibir la V-H⁺ATPasa hemos empleado un inhibidor de la bomba de protones de uso clínico, Esomeprazol y para inhibir el transportador de lactato MCT1, un compuesto, AZD3965, que inhibe de forma selectiva MCT1 y que se encuentra en fase clínica I (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01791595).

Los resultados obtenidos muestran que Esomeprazol a dosis altas induce la apoptosis e inhibe la proliferación de las células OE33. Este efecto pro-apoptótico se vió incrementado en presencia de sobrecarga de glucosa, por el contrario la sobrecarga de glucosa revirtió el efecto antiproliferativo de Esomeprazol. Por otra parte, el tratamiento con un inhibidor selectivo de MCT1, transportador que hemos constatado que expresa la línea celular utilizada en el estudio, OE33, no produjo ningún efecto ni en la apoptosis ni en la proliferación celular, a pesar de que a las dosis utilizadas hemos observado que incrementa la concentración de lactato a nivel intracelular.

El adenocarcinoma de esófago es un tumor con mal pronóstico con una supervivencia a 5 años inferior al 20%, por lo que es necesario investigar nuevas vías terapéuticas. Los estudios realizados en los últimos años sobre las implicaciones que la alteración del pH tumoral tiene en el desarrollo, progresión y resistencia a drogas quimioterápicas de las células tumorales han puesto de manifiesto que los mecanismos que regulan el intercambio de protones y otros metabolitos ácidos podrían ser una diana terapéutica prometedora en el tratamiento del cáncer.

La inhibición de la V-H⁺ATPasa mediante inhibidores específicos ha demostrado ejercer importantes efectos antineoplásicos^(60,61), pero la elevada toxicidad que estos fármacos tienen en el resto de tejidos sanos invalida su uso en la práctica clínica. En este sentido, los IBP, fármacos ampliamente utilizados para el tratamiento de patologías relacionadas con el ácido estomacal, han demostrado un efecto antineoplásico, debido a su acción sobre la V-H⁺ATPasa, en diferentes tumores.

En nuestro estudio, el tratamiento de las células de adenocarcinoma de esófago con

Esomeprazol a altas concentraciones incrementó la apoptosis e inhibió la proliferación, lo que concuerda con estudios previos que han demostrado un efecto antiproliferativo y proapoptótico de los IBP en otros tipos de tumores⁽³⁹⁾. Las concentraciones de Esomeprazol que hemos empleado en el cultivo estaban en un rango de 0 a 200 μM . Estas concentraciones no se consiguen con las dosis utilizadas en la práctica clínica para tratar el reflujo ácido, que se encontrarían en torno a 7 μM tras la ingesta de 20 mg/día⁽⁶²⁾. En el tratamiento del síndrome de Zollinger-Ellison en el que se emplean dosis de 120 mg/día, se alcanzan concentraciones de fármaco en sangre de 42 μM ⁽⁶³⁾. El empleo de dosis más altas no es habitual en la práctica clínica, y existen pocas evidencias de las consecuencias del uso de dosis tan altas. Sin embargo, existen estudios realizados en ratones en los que se emplearon dosis más altas sin observar ningún efecto secundario⁽⁶⁴⁾.

Por otra parte, se ha sugerido que dado que tras su protonación el esomeprazol tiende a acumularse selectivamente en los compartimentos ácidos, teóricamente se podrían alcanzar concentraciones elevadas en el interior del tumor suministrando dosis más bajas, si bien este hecho no se ha demostrado todavía. En este estudio, hemos utilizado dos concentraciones diferentes de glucosa en el medio. El medio de cultivo que se utiliza para esta línea celular, RPMI 1640, es un medio rico en glucosa, ya que contiene una concentración de 11 mM, lo que equivaldría a una concentración aproximada en sangre de 198 mg/dL. La razón de utilizar una concentración aún superior de glucosa (30 mM) fue la de forzar la producción de ácido láctico y conseguir así una mayor acidificación a nivel intracelular al combinar una mayor producción de ácido junto con el bloqueo de la extrusión de protones al espacio extracelular inducido por el IBP, aumentando así el efecto citotóxico del mismo. Por ello, en primer lugar, realizamos experimentos para determinar si nuestra línea tumoral seguía el llamado efecto Warburg, es decir, metabolizar la glucosa a ácido láctico en situación de normoxia. En este estudio pudimos comprobar que la concentración de lactato intracelular de las células OE33 incubadas en medio con sobrecarga de glucosa (30 mM) era superior a las células cultivadas en medio estándar.

Tal y como esperábamos, la sobrecarga de glucosa produjo un mayor aumento de la apoptosis inducida por esomeprazol. Sin embargo, paradójicamente, la presencia de mayor concentración de glucosa en el medio abolió totalmente el efecto antiproliferativo del Esomeprazol. La conciliación de estos dos efectos antagónicos observados con la sobrecarga de glucosa en las células tratadas con Esomeprazol, aumento de apoptosis y estímulo de la proliferación, pasa por considerar la existencia de dos poblaciones celulares distintas en la línea OE33 con diferente grado de diferenciación neoplásica y con respuestas metabólicas diferentes.

En cualquier caso, estos resultados invalidan la estrategia terapéutica de asociar un

IBP junto con una sobrecarga de glucosa de cara a su aplicación en la clínica, ya que el efecto antiproliferativo de Esomeprazol es anulado por la glucosa.

El otro inhibidor que hemos empleado en nuestro estudio es el AZD3965, un inhibidor selectivo del transportador de monocarboxilatos MCT1, desarrollado por AstraZeneca. Este compuesto ha demostrado tener una buena biodisponibilidad administrado por vía oral y se encuentra ya en ensayo clínico fase I para el tratamiento de tumores sólidos avanzados.

Las proteínas MCT1 y MCT4 están implicadas en el transporte de lactato, y se ha propuesto que su inhibición tendría como diana selectiva aquellas células tumorales altamente glicolíticas⁽⁶⁵⁾. El ácido láctico se produce durante la glicólisis, y el transportador MCT1 transporta lactato junto a un protón, de forma que MCT1 además disminuye la acidificación intracelular durante condiciones de flujo glicolítico elevado.

Estudios previos en células tumorales de estómago y de pulmón, han demostrado la capacidad de este compuesto para inhibir tanto el eflujo como el influjo de lactato en las células e inhibir el crecimiento tumoral tanto in vitro como in vivo en modelos animales⁽⁶⁶⁾. En otro estudio, el AZD3965 combinado con radioterapia mostró un efecto antitumoral sinérgico⁽⁶⁷⁾.

En nuestro estudio, el tratamiento con AZD3965 a dosis de 100 y 10 nM no indujo ningún efecto ni en la apoptosis ni en la proliferación de las células de adenocarcinoma de esófago. Con objeto de comprobar si estas dosis no eran suficientes para bloquear el transportador MCT1 en nuestra línea celular, determinamos la concentración de lactato intracelular tras la exposición al compuesto. Aunque sólo se realizó un experimento, los resultados mostraron mayor concentración de lactato en aquellas células que habían sido tratadas con AZD3965 que las que no habían recibido tratamiento tanto sin como con sobrecarga de glucosa, y a las dos dosis testadas, lo que indica que estas dosis son suficientes para inhibir el transportador MCT1.

Sin embargo, este aumento de lactato a nivel intracelular no provocó ningún efecto apoptótico ni antiproliferativo. Este resultado sugiere que el tratamiento con AZD3965 puede no ser una alternativa terapéutica en el adenocarcinoma de esófago, pero, puesto que estos resultados corresponden a una única línea celular, es necesario testar el compuesto con diferentes líneas de adenocarcinoma de esófago antes de concluir que no es efectivo.

Por otra parte, algunos investigadores como Sonveaux y colaboradores han propuesto la existencia de una simbiosis metabólica en tumores sólidos donde el lactato producido por las células tumorales del compartimento hipóxico del tumor sería captado por las población de células oxigenadas del tumor y utilizado para obtener energía⁽⁶⁸⁾. Desde este punto de visto, la inhibición de la salida de lactato al espacio extracelular podría tener un impacto negativo en el crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis. Este aspecto también debería ser investigado antes de

descartar el uso de AZD3965 como agente terapéutico para el adenocarcinoma de esófago.

CONCLUSIONES

1. Esomeprazol a altas concentraciones ejerce efectos antineoplásicos in vitro en células de adenocarcinoma de esófago, inhibiendo la proliferación e induciendo la muerte por apoptosis. La presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo potencia el efecto proapoptótico de Esomeprazol pero revierte el efecto antiproliferativo del mismo.
2. La línea celular de adenocarcinoma de esófago OE33 aumenta la producción de lactato en presencia de mayor concentración de glucosa en el medio de cultivo.
3. Las células OE33 expresan el transportador MCT1, mostrando localización a nivel de membrana plasmática preferentemente.
3. El tratamiento con AZD3965, un inhibidor selectivo del transportador de lactato MCT1, a concentraciones de 10 y 100 nM, produce un aumento de la concentración de lactato intracelular, si bien, no ejerce ningún efecto en los fenómenos de proliferación y apoptosis en las células de adenocarcinoma de esófago OE33.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Proceso transformación neoplásica.

Figura 2: Principales transportadores de membrana implicados en el mantenimiento del desbalance pH_e/pH_i de las células tumorales y su papel en el transporte de los fármacos quimioterápicos.

Figura3: Regulación del pH en condiciones de hipoxia y normoxia.

Figura 4: Microfotografías mostrando la tinción inmunohistoquímica del transportador MCT1.

Figura 5. Concentración intracelular de lactato en las células OE33 en medio RPMI 1640 (concentración de glucosa 11 mM) y después de sobrecarga de glucosa en el medio (concentración de glucosa 30 mM). $n=3$.

Figura 6: Ejemplo de análisis de apoptosis por citometría de flujo. Fueron consideradas células apoptóticas aquellas incluidas en los cuadrantes Q2.

Figura 7. Efecto de Esomeprazol con/sin sobrecarga de glucosa sobre la apoptosis de células OE33.

Figura 8. Imagen representativa de un experimento de ciclo celular por citometría de flujo.

Figura 9. Efecto de Esomeprazol con/sin sobrecarga de glucosa sobre la proliferación de las células OE33.

INSTRUMENTO	MARCA	MODELO
Agitador tipo Vórtex	OVAN	Vibra Mix
Agitador de placas	EPPENDORF	Thermomixer Confor
Campana de cultivo de flujo laminar	TELSTAR	Bio II Advance
Citómetro de flujo	BD	FACSAria
Centrífuga Refrigerada	EPPENDORF	5417R
Centrífuga NO Refrigerada	EPPENDORF	Mini Spin Plus
Contenedor de Congelación	Mr. Frosty	Nalgene
Equipo de Inmunotinción Automático	DAKO	Autostainer Plus Link
Estufa de Cultivo	186 JOUAN	
Frigorífico 4°C	LYNX	
Frigorífico -20°C	Sanyo	MDF-U333
Ultracongelador -80°C		
Lector de Placas	BIOTEK	SYNERGY
Maquina de Hielo Triturado	B-LINE	BF-85
Microcentrifuga Refrigerada	EPPENDORF	5417R
Micropipetas	Thermo	Finnpipette
Microscopio Confocal espectral	LEICA	TCS SP2
pH-Metro	CRISON	pH-Meter Basic 20+
Tanque de nitrógeno líquido	LINDE	
Unidad de Confección de bloques de parafina	LEICA	Leica EG1150

Tabla 1. Instrumentos empleados durante la realización de la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhang ZF, Kurtz RC, Sun M, Karpeh M Jr, Yu GP, Gargon N, Fein JS, Georgopoulos SK, Harlap S. Adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia: medical conditions, tobacco, alcohol, and socioeconomic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5(10):761-8.
2. Bani-Hani KE, Bani-Hani BK. Pathogenesis of columnar-lined esophagus. *World J Gastroenterol* 2006; 12(10):1521-8.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
4. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R; Globale Konsensusgruppe. The Montreal definition and classification of gastro-oesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006;101(8):1900-20.
5. El-Serag H. Role of obesity in GORD-related disorders. *Gut* 2008;57(3):281-4.
6. Raj A, Jankowski J. Acid suppression and chemoprevention in Barrett oesophagus. *Dig Dis* 2004;22(2): 171-80.
7. Souza RF, Krishnan K, Spechler SJ. Acid, bile, and CDX: the ABCs of making Barrett's metaplasia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295(2):211-18.
8. Vaezi MF, Richter JE. Role of acids and duodenogastroesophageal reflux in gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1996;111(5):1192-9.
9. Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, Vieth M, Stolte M, Talley NJ, Agréus L.. Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study. *Gastroenterology* 2005;129(6): 1825-31.
10. Henihan RD, Stuart RC, Nolan N, Gorey TF, Hennessy TP, O'Morain CA. Barrett's esophagus and the presence of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(4):542-6..
11. Malfertheiner P, Lind T, Willich S, Vieth M, Jaspersen D, Labenz J, Meyer-Sabellek W, Junghard O, Stolte M.. Prognostic influence of Barrett's oesophagus and *Helicobacter pylori* infection on healing of erosive gastro-oesophageal (GORD) and symptom resolution in non-erosive GORD: report from the ProGORD Study. *Gut* 2005;54(6): 746-51.
12. Levine DM, Ek WE, Zhang R, Liu X, Onstad L, Sather C, Lao-Sirieix P, Gammon MD, Corley DA, Shaheen NJ, Bird NC, Hardie LJ, Murray LJ, Reid BJ, Chow WH, Risch HA, Nyrén O, Ye W, Liu G, Romero Y, Bernstein L, Wu AH, Casson AG, Chanock SJ, Harrington P, Caldas I, Debiram-Beecham I, Caldas C, Hayward NK, Pharoah PD, Fitzgerald RC, Macgregor S, Whiteman DC, Vaughan TL. A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Nat Genet* 2013; 45(12):1487-93.

13. Parrilla P, Liron R, Martinez de Haro LF, Ortiz A, Molina J, De Andrés B. Gastric surgery does not increase the risk of developing Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1997; 92(6):960-3.
14. Su Z, Gay LJ, Strange A, Palles C, Band G, Whiteman DC, Lescai F, Langford C, Nanji M, Edkins S, van der Winkel A, Levine D, Sasieni P, Bellenguez C, Howarth K, Freeman C, Trudgill N, Tucker AT, Pirinen M, Peppelenbosch MP, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Drenth JP, Peters WH, Reynolds JV, Kelleher DP, McManus R, Grabsch H, Prenen H, Bisschops R, Krishnadath K, Siersema PD, van Baal JW, Middleton M, Petty R, Gillies R, Burch N, Bhandari P, Paterson S, Edwards C, Penman I, Vaidya K, Ang Y, Murray I, Patel P, Ye W, Mullins P, Wu AH, Bird NC, Dallal H, Shaheen NJ, Murray LJ, Koss K, Bernstein L, Romero Y, Hardie LJ, Zhang R, Winter H, Corley DA, Panter S, Risch HA, Reid BJ, Sargeant I, Gammon MD, Smart H, Dhar A, McMurtry H, Ali H, Liu G, Casson AG, Chow WH, Rutter M, Tawil A, Morris D, Nwokolo C, Isaacs P, Rodgers C, Ragunath K, MacDonald C, Haigh C, Monk D, Davies G, Wajed S, Johnston D, Gibbons M, Cullen S, Church N, Langley R, Griffin M, Alderson D, Deloukas P, Hunt SE, Gray E, Dronov S, Potter SC, Tashakkori- Ghanbaria A, Anderson M, Brooks C, Blackwell JM, Bramon E, Brown MA, Casas JP, Corvin A, Duncanson A, Markus HS, Mathew CG, Palmer CN, Plomin R, Rautanen A, Sawcer SJ, Trembath RC, Viswanathan AC, Wood N, Trynka G, Wijmenga C, Cazier JB, Atherfold P, Nicholson AM, Gellatly NL, Glancy D, Cooper SC, Cunningham D, Lind T, Hapeshi J, Ferry D, Rathbone B, Brown J, Love S, Attwood S, MacGregor S, Watson P, Sanders S, Ek W, Harrison RF, Moayyedi P, de Caestecker J, Barr H, Stupka E, Vaughan TL, Peltonen L, Spencer CC, Tomlinson I, Donnelly P, Jankowski JA; Esophageal Adenocarcinoma Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Common variants at the MHC locus and at chromosome 16q24.1 predispose to Barrett's esophagus. *Nat Genet* 2012; 44(10):1131-6.
15. Hur C, Miller M, Kong CY, Dowling EC, Nattinger KJ, Dunn M, Feuer EJ. Trends in esophageal adenocarcinoma incidence and mortality. *Cancer* 2013; 119(6):1149-58.
16. Jankowski JA, Harrison RF, Perry I, Balkwill F, Tselepis C. Barrett's metaplasia. *Lancet* 2000; 356(9247):2079-85.
17. Wang KK, Sampliner RE; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology.. Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology.Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(3):788-97.
18. Buttar NS, Wang KK, Sebo TJ, Riehle DM, Krishnadath KK, Lutzke LS, Anderson MA, Petterson TM, Burgart LJ.. Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2001; 120(7):1630-9.
19. Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high- risk patient subsets. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(7):1669-76.
20. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G.. Dynamic effects of acid on Barrett's esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest* 1996; 98(9):2120- 8.

21. Souza RF, Shewmake K, Terada LS, Spechler SJ.. Acid exposure activates the mitogen- activated protein kinase pathways in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122(2):299- 307.
22. Ouatu-Lascar R, Fitzgerald RC, Triadafilopoulos G. Differentiation and proliferation in Barrett's esophagus and the effects of acid suppression. *Gastroenterology* 1999; 117(2):327- 35.
23. El-Serag HB, Aguirre TV, Davis S, Kuebel M, Bhattacharyya A, Sampliner RE. Proton pump inhibitors are associated with reduced incidence of dysplasia in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(10): 1877-83.
24. Cooper BT, Chapman W, Neumann CS, Gearty JC. Continuous treatment of Barrett's esophagus patients with proton pump inhibitors up to 13 years: observations on regression and cancer incidence. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23(6):727-33.
25. Hillman LC, Chiragakis L, Shadbolt B, Kaye GL, Clarke AC. Proton-pump inhibitor therapy and the development of dysplasia in patients with Barrett's esophagus. *Med J Aust* 2004; 180(8):387-91.
26. Singh S, Garg SK, Singh PP, Iyer PG, El-Serag HB. Acid-suppressive medications and risk of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2014;63(8):1229-37.
27. Kuipers EJ. Barrett's esophagus, proton pump inhibitors and gastrin: the fog is clearing. *Gut* 2010;59(2): 148-9.
28. Wang JS, Varro A, Lightdale CJ, Lertkowitz N, Slack KN, Fingerhood ML, Tsai WY, Wang TC, Abrams JA. Elevated serum gastrin is associated with a history of advanced neoplasia in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2010; 105(5):1039-45.
29. García Rodríguez LA, Lagergren J, Lindblad M. Gastric acid suppression and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma: a nested case control study in the UK. *Gut* 2006; 55(11):1538-44.
30. Havid-Jensen F, Pedersen L, Funch-Jensen P, Drewes AM. Proton pump inhibitor use may not prevent high-grade dysplasia and esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus: a nationwide study of 9883 patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39(9):984-91.
31. Wetscher GJ, Hinder RA, Smyrk T, Perdakis G, Adrian TE, Profanter C. Gastric acid blockade with omeprazole promotes gastric carcinogenesis induced by duodenogastric reflux. *Dig Dis Sci* 1999; 44(6): 1132-5.
32. Wetscher GJ, Profanter C, Gadenstätter M, Perdakis G, Glaser K, Hinder RA. Medical treatment of gastroesophageal reflux disease does not prevent the development of Barrett's metaplasia and poor esophageal body motility. *Langenbecks Arch Chir* 1997; 382(2):95-9.
33. Spechler SJ, Souza RF. Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 2014; 371(9):836-45.

34. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ, Triadafilopoulos G, Geboes K, Casson AG, Kerr D, Young LS. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154(4):965-73.
35. Lagergren J, Bergström R, Nyrén O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999; 130(11):883-90.
36. Fais S, De Milito A, You H, Qin W. Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer. (review) *Cancer Res* 2007; 67(22):10627-30.
37. Jaleh Barar, Yadollah Omid. Dysregulated pH in Tumor Microenvironment Checkmates Cancer Therapy. *BiolImpacts*, 2013, 3(4), 149-162
38. Andrew P. Halestrap and Marieangela C. Wilson. The Monocarboxylate Transporter Family—Role and Regulation. *Life*, February 2012, 64(2): 109–119
39. De Milito A, Marino ML, Fais S.. A rationale for the use of proton pump inhibitors as antineoplastic agents. *Curr Phar Des* 2012; 18(10):1395-406.
40. Raghunand N, Mahoney B, van Sluis R, Baggett B, Gillies RJ. Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia* 2001; 3(3):227-35.
41. Calorini L, Peppicelli S, Bianchini F. Extracellular acidity as favouring factor of tumor progression and metastatic dissemination. *Exp Oncol* 2012; 34(2):79-84.
42. Bourguignon LY, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *Biol Chem* 2004; 279(26):26991-7007.
43. Busco G, Cardone RA, Greco MR, Bellizzi A, Colella M, Antelmi E, Mancini MT, Dell'Aquila ME, Casavola V, Paradiso A, Reshkin SJ. NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the periinvadopodial space. *FASEB J* 2010; 24(10):3903- 15.
44. Moellering RE, Black KC, Krishnamurty C, Baggett BK, Stafford P, Rain M, Gatenby RA, Gillies RJ. Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25(4):411-25.
45. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 2006; 66(13):6699-707.
46. Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* 2001; 61(16):6020-4.
47. Luciani F, Spada M, De Milito A, Molinari A, Rivoltini L, Montinaro A, Marra M, Lugini L, Logozzi M, Lozupone F, Federici C, Iessi E, Parmiani G, Arancia G, Belardelli F, Fais S. Effect of proton pump inhibitor pre-treatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(22):1702-13.

48. Raghunand N, Mahoney BP, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(7):1219-29.
49. Mahoney BP, Raghunand N, Baggett B, Gillies RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(7):1207-18.
50. Calcinato A, Filipazzi P, GRioni M, Iero M, DE Milito A, Ricupito A, Cova A, Canese R, Jachetti E, Rossetti M, Huber V, Permian G, Generoso L, Santinami M, Borghi M, Fais S, Bellotee M, Rivoltini L. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res.* 2012; 72: 2746-56.
51. Avnet S, Di Pompo G, Lemma S, Salerno M, Perut F, Bonuccelli G, Granchi D, Zini N, Baldini N. V-ATPase is a candidate therapeutic target for Ewing sarcoma. *BiochimBiophys Acta.* 2013; 1832: 1105-16.
52. Ishiguro T, Ishiguro M, Ishiguro R, Iwai S. Cotreatment with dichloroacetate and omeprazole exhibits a synergistic anti proliferative effect on malignant tumors. *Once Lett.* 2012; 3: 726-728.
53. Avnet S, Di Pompo G, Lemma S, Salerno M, Perut F, Bonuccelli G, Granchi D, Zini N, Baldini N.. V-ATPase is a candidate therapeutic target for Ewing sarcoma. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(8):1105-16.
54. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G; Altered sodium-hydrogen exchange activity is a mechanism for acid induced hyper proliferation in Barrett's esophagus. Gastroenterology Section, Palo Alto Veterand Affairs Health Care System, Palo Alto 94304; and Gastroenterology Division, Stanford University School of Medicine. Stanford, California 94305-5487.
55. Harguindey S, Arranz JL, Polo Orozco JD, Rauch C, Fais S, Cardone RA, Reshkin SJ. Cariporide and other new and powerful NHE1 inhibitors as potentially selective anticancer drugs—an integral molecular/biochemical/methabolic/clinical approach after one hundred years of cancer research. *J Transi Med.* 2013;11:282.
56. Reshkin SJ, Bellizzi A, Caldera S, Albarani V, Malachi I, Pongee M, Alunni-Fabbroni M, Casavola V, Tommasino M. Na⁺/H⁺ exchanger-dependent intracellular alkalization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequences transformation-associated phenotypes. *FASEB J.* 2000; 14: 2185-97.
57. Volk T, Jähre E, Fortmeyer HP, Glüsenkamp KH, Rajewsky MF. pH in human tumor xenografts: effect of intravenous administration of glucose. *Br J Cancer* 1993; 68: 492-500.
58. Sennoune SR, Bakunts K, Martínez GM, Chua-Tuan JL, Kebir Y, Attaya MN, Martínez- Zaguilán R. Vacuolar H⁺- ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(6):C1443- 52.
59. Rockett JC, Larkin K, Darnton SJ, Morris AG, Matthews HR 1997 Five newly established oesophageal carcinoma cell lines: phenotypic and immunological characterization. *Br J Cancer.* 75(2):258-63.

-
60. Hinton A, Bond S, Forgac M. V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch* 2009; 457: 589-98.
61. Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Uramoto H, Yoshida Y, Tanabe M, Ise T, Murakami T, Yoshida T, Nomoto M, Kohno K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 541-9.
62. Katagiri F, Inoue S, Itoh H, Takeyama M. Omeprazole raises somatostatin and motilin in human plasma. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 370-3.
63. Frucht H, Maton PN, Jensen RT. Use of omeprazole in patients with Zollinger-Ellison syndrome. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 394-404.
64. De Milito A, Canese R, Marino ML, Borghi M, Iero M, Villa A, Venturi G, Lozupone F, Iessi E, Logozzi M, Della Mina P, Santinami M, Rodolfo M, Podod F, Rivoltini L, Fais S. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* 2010; 127: 207-19.
65. Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life*. 2012;64:109-19.
66. Polański R, Hodgkinson CL, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, Trapani F, Bishop PW, White A, Critchlow SE, Smith PD, Blackhall F, Dive C, Morrow CJ. Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20:926-37.
67. Bola BM, Chadwick AL, Michopoulos F, Blount KG, Telfer BA, Williams KJ, Smith PD, Critchlow SE, Stratford IJ. Inhibition of monocarboxylate transporter-1 (MCT1) by AZD3965 enhances radiosensitivity by reducing lactate transport. *Mol Cancer Ther*. 2014;13:2805-16.
68. Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, De Saedeleer CJ, Kennedy KM, Diepart C, Jordan BF, Kelley MJ, Gallez B, Wahl ML, Feron O, Dewhirst MW. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:3930-42.