

## **Integración multidisciplinaria de campos oncológicos a través de mecanismos cruciales y vías comunes. De etiopatogénesis a tratamiento<sup>#</sup>**

S. Harguindey\*, G. Orive\*\*, J. L. Pedraz\*\*

### **Resumen**

Diferentes campos de investigación tales como la etiopatogénesis de las enfermedades neoplásicas, la apoptosis específica de las células cancerosas, la resistencia múltiple a fármacos (RMD), la actividad de oncogenes, la neovascularización, la regresión espontánea del cáncer (REC), e incluso aspectos claves de la quimioterapia, comparten ciertos hechos fundamentales, mecanismos comunes y características, básicas y clínicas, íntimamente relacionadas. Más allá de una amplia gama de factores involucrados en una misma actividad, diversos agentes y métodos antineoplásicos comparten asimismo ciertos mecanismos cruciales y vías finales comunes de actuación. Esta revisión creativa discute, a la vez que propone, una integración jerárquica de campos previamente separados de la investigación y el tratamiento oncológico. A modo de integración científica, y a través de la creación de un lenguaje mediador entre la investigación básica y clínica, la perspectiva aquí desarrollada permite una significativa mejora en la comprensión de la esencia fundamental de las enfermedades cancerosas. El modelo aquí considerado presenta el potencial de acercar a la deseada meta de lograr una penetración lo más profunda y completa posible de la naturaleza íntima de la degeneración maligna a la vez que abre la posibilidad de nuevos y selectivos avances terapéuticos.

#### **Palabras clave:**

Etiopatogenia del cáncer y tratamiento. Resistencia múltiple a fármacos antineoplásicos. Apoptosis. Neovascularización. Antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y cáncer. pH y cáncer. Regresión espontánea del cáncer.

**Oncología, 2002; 25 (7):295-316**

---

\* Oncología Médica. Centro Médico La Salud. Vitoria.

\*\* Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. Vitoria

# Este trabajo ha sido realizado en parte merced a una ayuda de la Fundación Castresana.

Recibido: 21.05.02

Aceptado: 03.06.02

## Summary

Different fields of cancer research, such as cancer etiopathogenesis, selective apoptosis, multiple drug resistance (MDR), oncogen activation, neovascularization, the spontaneous regression of cancer (SRC) and certain key aspects of cancer chemotherapy, all share some deep-seated, both basic and clinical, features and characteristics. Beyond a wide array of intermediary factors involved in a certain activity, different anticancer agents and anticancer methods have in common some intimate pivotal and/or final pathways. This creative review discusses, as well as proposes, the integration of previously disparate fields of cancer research and treatment. Like a scientific Esperanto dwelling in between basic and clinical research, the perspective here developed mediates in the integration of different fields of cancer research at both of these levels. At the same time, it allows a significant improvement in the understanding of the fundamental nature of cancerous diseases. The model here presented finally stimulates the high aim of reaching a deeper and more complete comprehension of the intimate nature of the malignant process, at the same time that opens new and selective therapeutic possibilities.

**Key words:** Cancer etiopathogenesis and treatment. Multiple drug resistance. Apoptosis. Neovascularization.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiporter and cancer. pH and cancer. Spontaneous regression of cancer.

*“ Sólo podemos curar lo que primero podemos entender”*

Otto Warburg

## Introducción

### De la etiopatogénesis al tratamiento. Dos caras de una moneda al unísono para una perspectiva integral

Un creciente número de publicaciones recientes han llamado la atención sobre diversos aspectos de la dinámica del ion de hidrógeno en algunas de las principales áreas de investigación oncológica, tanto básicas como clínicas. Estas áreas de la investigación cubren un amplio rango de enfoques, que van desde los mecanismos mediadores de la REC a la comprensión de la etiopatogénesis de los tumores epiteliales, y desde la apoptosis, la RMD y la neovascularización tumoral a la apertura de nuevas e inéditas posibilidades terapéuticas. Por otra parte se ha mostrado que, por aparentemente distintos que sean todos estos campos de investigación en oncología, pueden ser enfocados desde una única perspectiva de raíz, consiguiéndose así integrar aspectos cruciales de todos y cada uno de ellos<sup>1</sup>. Recientes descubrimientos e interpretaciones en estas áreas permiten concebir modelos conceptuales cada vez más amplios y acogedores que se dirigen a la construcción de paradigmas de mejor comprensión y mayor alcance. Desde un punto de vista general y epistemológico, cualquier esfuerzo por integrar jerár-

quicamente perspectivas inicialmente fragmentadas necesariamente conduce hacia una progresiva unificación y sinergia entre las diferentes áreas de la investigación oncológica. Por estas vías se estimula a su vez una aproximación cada vez más radical a los procesos neoplásicos en aras de descubrir sutiles mecanismos subyacentes comunes a una multitud de hallazgos previamente aislados entre sí y que hasta un momento determinado no había sido posible cohesionarlos de forma jerárquica, racional y científica.

### 1. Una cara de la moneda - Oncogénesis y etiopatogénesis

Considerando en primer lugar el extremo inferior del espectro de concentración intracelular de hidrogeniones ( $[\text{H}^+]$  i. c.) (zona limítrofe de  $[\text{H}^+]$  baja, o, lo que es lo mismo, pH i. c. o  $\text{pH}_i$  elevado), la inducción y/o mantenimiento de una alcalinización celular patológicamente elevada ha sido implicada, y demostrada inequívocamente, tanto en la transformación neoplásica como en el mantenimiento de la situación cancerosa<sup>2, 3</sup>. Esta alteración de la homeostasis global de la célula juega asimismo un papel crucial y de pivote en la transducción de señales de una amplia variedad de factores de crecimiento, un hecho en gran parte mediado por la estimulación del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana celular. En condiciones normales esta bomba expulsa iones  $\text{H}^+$  de la célula intercambiándolo por  $\text{Na}^+$ , con el consiguiente aumento del  $\text{Na}^+$  intracelular<sup>4-8</sup>. De esta forma se induce una persistente des-

viación del equilibrio ácido-básico intracelular en la dirección de la alcalinidad, la cual está directamente implicada en la entrada de las células en la fase S del ciclo celular así como en el mantenimiento de la célula en un estado de proliferación continua e incontrolada<sup>9, 12</sup>. De ahí que se considere hoy en día que una de las características más sobresalientes de las células cancerosas de múltiples estirpes y procedencias genéticas es la pérdida del, por lo general riguroso, control del pH intracelular, tanto en la situación aguda como en la crónica<sup>3, 12-14</sup>.

Asimismo, una elevación patológica del pH<sub>i</sub> está específicamente involucrada en la patogenia de la resistencia múltiple a fármacos antineoplásicos (RMD). Este hecho es mayormente secundario a la estimulación de la actividad del transportador de RMD, la P-glicoproteína, responsable de una severa alcalinización del citosol<sup>12-15</sup>. Una de las consecuencias más significativas de este desequilibrio ácido-básico es la resistencia a fármacos como el cis-platino, la adriamicina, el paclitaxel, etc. Así, es muy significativo que en células de cáncer de pulmón humano, aunque también en el de mama, la resistencia a la adriamicina se pueda multiplicar por un factor de más de 1000 a un pH<sub>i</sub> elevado, y que dicha RMD sea directamente proporcional al grado de pH<sub>i</sub><sup>14</sup>. Este hecho fundamental hace comprensible que el persistir en el tratamiento de ciertos tumores bajo sus habituales condiciones de vida ácido-básica y desequilibrio alcalino se tope con un fracaso previsible, a modo de muerte terapéutica anunciada. Por el contrario, la inducción de un cambio ácido del citosol permite la retención de agentes quimioterapéuticos y la superación de la RMD en un elevado número de estudios y variadas circunstancias<sup>8, 13-19</sup>.

De forma parecida, la actividad de algunos oncogenes, así como una multiplicidad de factores de crecimiento, está mediada por una elevación del pH<sub>i</sub>, un hecho asimismo debido a la activación del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup><sup>20-25</sup>. Se ha demostrado que una alcalinización celular así inducida es una condición *sine que non* para la activación desde el estadio de protooncogen al de oncogen activo, incluso con la presencia de bicarbonato en el medio de cultivo<sup>3, 5, 20-22</sup>. Abarcando toda variabilidad genética, dicha alcalosis celular, junto con el metabolismo glicolítico, se reconocen como los dos factores patognomónicos y comunes a las diversas células y tumores cancerosos<sup>3</sup>. Una elevación del pH<sub>i</sub> es asimismo esencial en la acción anti-apoptótica de los productos génicos Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, lo que justifica la resistencia a la quimioterapia bajo dichas circunstancias microambientales y condicionamientos intracelulares<sup>23-25</sup>.

## El antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y el pH<sub>i</sub> en la transformación, patogenia y progresión del cáncer

Es altamente significativo que la misma anomalía homeostática que juega un papel en la transformación y desarrollo tumoral a nivel celular<sup>1-3, 26-31</sup>, sea la misma que sistemáticamente precede e incide en la carcinogénesis de las diversas mucosas y áreas del organismo; es decir, un pH epitelial localmente elevado en los lugares de posterior aparición de diversos procesos neoplásicos y tumores malignos<sup>1, 30, 32-37</sup>. Esta misma alteración ácido-básica a nivel tisular estimula asimismo, tanto directa como indirectamente, la carcinogénesis química de los epitelios<sup>30-32</sup>. Se considera también que dicha desviación patológica juega un papel determinante en la progresión tumoral y en el proceso metastático<sup>3, 38</sup>.

Entre las diferentes bombas de membrana que juegan una importante función en el control de la homeostasis intracelular, el sistema antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> de la membrana celular es reconocido como el factor preponderante y mecanismo por excelencia en la estricta regulación y control del equilibrio ácido-básico de las células, principalmente a través de su isoforma 1 (NHE<sub>1</sub>)<sup>1, 11, 39-41</sup>. Su activación, ya sea medioambientalmente inducida o por una sobreexpresión genéticamente condicionada, eleva el pH<sub>i</sub>. En condiciones normales, este mecanismo crucial y vía común también funciona como un sistema de protección y defensa celular contra una acidosis celular potencialmente dañina<sup>5</sup>. Este antiportador es asimismo la principal diana, mecanismo crucial y vía común de una gran variedad de estímulos carcinogénicos, como la P-glicoproteína, el factor génico antiapoptótico Bcl-2, ésteres de forbol, tirosinoquinasa, EGF, TGF-α, IGF-II, otros diversos factores de crecimiento, diferentes productos químicos y fármacos, etc.<sup>7, 42-45</sup>.

Paralelamente, ha sido corroborado recientemente que células neoplásicas de diferentes orígenes, desde leucemias a tumores sólidos, animales y humanas por igual, sistemáticamente presentan un pH<sub>i</sub> anormalmente elevado<sup>11</sup>. Específicamente, células leucémicas humanas de las más variadas estirpes, de forma similar a las de los tumores malignos, viven en un estado de alcalinización intracelular permanente e incambiable. Además existen y se multiplican a unos niveles de pH<sub>i</sub> en el límite de la compatibilidad con la vida celular, y por extensión, con la vida humana en general (7.46 a 7.6, e incluso más altos)<sup>11, 13, 14, 16, 46-49</sup>. De ahí que una alcalosis celular maligna extrema y patológica haya sido considerada la característica específica del estado canceroso<sup>3</sup>. Dicha anomalía se intensifica aún más bajo la estimulación sobreañadida de diversos factores de crecimiento como los ésteres de forbol, etc.<sup>6, 48</sup>.

Es importante prestar atención al hecho de que las diferencias de  $pH_i$  son una medida analítica harto burda y engañosa. Ello se debe a que las diferencias habitualmente halladas entre las células normales y las neoplásicas, que al menos son de 0.3-0.4 unidades de  $pH_i$ , sobre todo si se consideran las células con RMD positiva, a pesar de su aparente insignificancia cuantitativa, están expresando cualitativamente que toda la fisiología global de la célula neoplásica tiene lugar a una concentración intracelular de iones de hidrógeno de al menos la mitad que las células normales<sup>50</sup>. Más significativamente aún, la diferencia en la concentración de  $H^+$  intracelular entre las células normales y cancerosas puede llegar a multiplicarse por un factor de 10, o incluso más, si la diferencia de  $pH_i$  es de una unidad. Esta circunstancia extrema puede incluso tener lugar cuando se compara la situación ácida necesaria para una apoptosis celular selectiva ( $pH_i < 6.8$ ) con un estado celular muy alcalinizado de la célula cancerosa, ya sea en condiciones basales o bajo estimulación de factores de crecimiento<sup>8, 11, 48</sup>.

Es ampliamente admitido que la sobreexpresión del antiportador  $Na^+/H^+$  de la membrana celular, genéticamente o medioambientalmente inducida, constituye el pivote y vía común para la específica elevación del  $pH_i$  en una multiplicidad de estirpes de células cancerosas y/o leucémicas<sup>3, 13, 14, 47-52</sup>. Esta desviación de la homeostasis celular parece constituir la respuesta universal a muchos y diferentes factores de crecimiento y estímulos carcinogénicos, mientras que la situación contraria nunca ha sido reportada. Dicha anomalía es tan determinante que el eflujo activo de protones de las células se mantiene en la situación neoplásica sin posible compensación ácido-básica, incluso en las habituales condiciones tumorales de un medio extracelular e intersticial ácido<sup>50</sup>. Este desequilibrio patológico se mantiene merced a una sobreestimulación, en ocasiones concertada y sinérgica, de las diferentes bombas de membrana electrogénicas relacionadas con el ion de hidrógeno, no sólo el antiportador  $Na^+/H^+$ , sino la  $Na^+/K^+$ -ATPasa<sup>39, 51-56</sup>, las  $H^+$ -ATPasas vacuolares<sup>1, 31</sup>, el simportador  $H^+/Cl^-$ , etc<sup>57</sup>.

Los pioneros estudios de Sparks y cols. en células transformadas mostraron inicialmente que, en propias palabras de estos autores, un "brote alcalino maligno" era responsable de la activación sinérgica de la bomba electrogénica  $Na^+/K^+$ -ATPase<sup>56, 58</sup>. Este mecanismo induce, y al mismo tiempo cierra, un "círculo vicioso alcalinizante", ya que la activación de la  $Na^+/K^+$ -ATPase también aumenta el  $pH_i$  a través de una estrategia integrada que involucra la estimulación conjunta, sinérgica y patológica del intercambio  $Na^+/H^+$ . No es de extrañar por lo tanto que estudios subsiguientes hayan de-

mostrado que la expresión y actividad del antiportador  $Na^+/H^+$  sea específicamente necesaria para el desarrollo de los tumores malignos. Así, células mutantes a las que, o bien les falta de forma natural, o bien se anula por métodos de ingeniería genética la actividad de este antiportador "alcalinizante" pierden su capacidad de transformación tumoral entre un 80 y un 100%<sup>5, 26, 27, 59</sup>. De forma paralela, la supresión de la actividad de una multiplicidad de factores de crecimiento, así como el detenimiento de la expresión genética del ciclo celular, pueden obtenerse por la disminución del  $pH$  citosólico mediante la utilización de diversos inhibidores del intercambio  $Na^+/H^+$ <sup>1, 59, 60-62</sup>. Estas consideraciones constituyen una nueva integración de hechos previamente inconexos que está abriendo un campo enteramente inexplorado que no sólo se dirige hacia nuevas posibilidades terapéuticas sino incluso a la prevención del cáncer<sup>1, 63</sup>.

#### **pH intracelular ( $pH_i$ ) y pH extracelular ( $pH_e$ ) tumorales: interrelaciones**

Las relaciones entre el  $pH_i$  y el  $pH_e$  ha sido un tema que ha generado una considerable confusión durante décadas de investigación de la bioquímica del cáncer, incluso desde sus inicios<sup>50, 64, 65</sup>. Es evidente que las células cancerosas, sobre todo si se muestran resistentes a toda actuación terapéutica (RMD), presentan alteraciones eléctricas de despolarización y disminución del potencial eléctrico de la membrana modificadas de forma inseparable de los mecanismos de homeostasis ácido-básica celular<sup>8, 14, 18</sup>. La evidencia en la que se basan estos hechos, claves para entender la fisiopatología de la degeneración neoplásica, proviene de estudios dinámicos que muestran que una elevación artificial del  $pH$  del medio extracelular ( $pH_e$ ) aumenta el  $pH$  del citosol ( $pH_i$ ) de las células neoplásicas, mientras que las células normales son capaces de mantener la homeostasis celular por debajo de un  $pH$  de 7.0 bajo parecidas circunstancias<sup>16</sup>. Incluso en microambientes ácidos las células transformadas poseen mecanismos reguladores en contra de la acidificación mucho más efectivos que las normales, defendiéndose de cualquier ataque ácido y/o terapéutico y/o apoptótico merced a una muy efectiva, dinámica y continua expulsión de iones de hidrógeno mediada por diversos mecanismos<sup>1, 5, 18, 23-25, 50</sup>.

Un factor adicional que ha contribuido a lo largo de los años a aumentar el grado de confusión en la investigación metabólica y bioquímica del cáncer es la gran cantidad de ácido láctico secretado por las células cancerosas de cualquier origen<sup>64, 65</sup>. Por paradójico que resulte a primera vista, dicha producción de ácido láctico

se ve aumentada aún más por el estímulo de la glicolisis inducido por una alcalinización añadida. Este círculo vicioso es principalmente debido al estímulo que una elevación del pH produce sobre el enzima clave de la glicolisis, la fosfofructokinasa<sup>66</sup>. Esto llevó en principio a pensar que el interior de la célula cancerosa se hallaba acidificada, cuando lo que ocurre es precisamente lo contrario. Aparte de que ello se deba sobre todo a una potenciación integrada de las diferentes bombas de hidrógeno de la membrana celular, el ácido láctico tumoral no consigue acidificar la célula tumoral, bien porque difunde fuera de ellas o porque es activamente expulsado, quedando acidificado, eso sí, el microambiente intratumoral extracelular e intersticial<sup>50, 65, 67</sup>.

### pH<sub>i</sub> y resistencia múltiple a fármacos antineoplásicos (RMD): relaciones causa-efecto

El estudio del fenómeno de la RMD, aunque en principio parezca un área de investigación aparte, camina de la mano de los demás campos oncológicos aquí considerados. Los consistentes resultados obtenidos por diversos grupos de investigación han originado un creciente interés debido a la relación directa existente entre un progresivo aumento del pH<sub>i</sub> tumoral y el grado de RMD. La relación directa entre un pH elevado y la resistencia múltiple a fármacos antineoplásicos es generalmente reconocida<sup>13-17, 47, 68, 69</sup>. Así, una alcalinización celular patológica, la situación "normal" en la que proliferan todo tipo de células malignas, disminuye la retención de antineoplásicos como la vinblastina, adriamicina, el cisplatino, etc.<sup>8, 17, 19</sup>. Este fenómeno puede ser debido bien a un antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> sobreestimulado o a otros mecanismos, algunos aún desconocidos<sup>14, 18</sup>. Así, un hecho altamente significativo es el aumento de hasta 2000 veces de la resistencia a la adriamicina en células de carcinoma de pulmón humano si el pH<sub>i</sub> de 7.0 presente en células paternas se eleva a 7.4 o más en las células más resistentes (Fig. 1). Paralelamente, la superación de dicha resistencia por verapamil es directamente debida a la acidificación celular inducida por dicho fármaco<sup>14</sup>. Muy por el contrario, la concentración intracelular de adriamicina se multiplica por al menos 100 veces al inducir una acidificación celular, cambio ácido-básico que se comporta directamente así como un poderoso "agente quimio-sensitizador"<sup>18, 70</sup>. Es interesante anotar que alguna publicación aparentemente contradictoria, en la cual potentes derivados del amilorida no se han mostrado efectivos para revertir la RMD a la adriamicina y a la vincristina no reportan estudios simultáneos de pH<sub>i</sub> en sus sistemas<sup>19</sup>. Dicha situación aparentemente paradójica y contradictoria es debida,

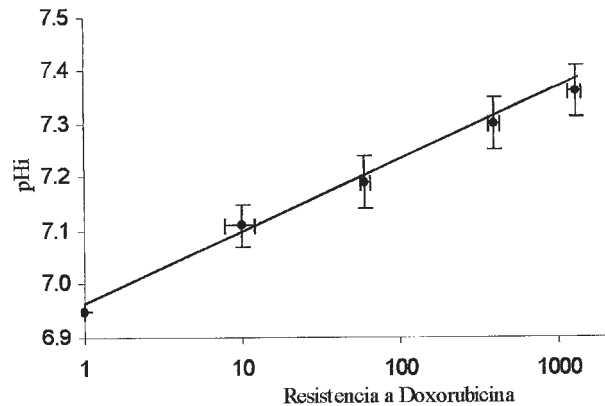


Fig. 1. Grado de resistencia a la doxorubicina en función del pH citosólico de células de cáncer de pulmón humano SW-1573. (Keizer HG, Joenje H. Increased cytosolic pH in multidrug-resistant human lung tumor cells: effect of verapamil. JNCI 1989; 81:706-709. Reproducido por cortesía de H. Joenje y Oxford University Press. Para más detalles ver ref. 14.)

a decir de algunos autores, a factores como la detención del ciclo celular en G1 por la amilorida, lo que insensibiliza a las células a los inhibidores de la topoisomerasa-1 como la campotecina, la ciclohexemida o a la radiación gamma. Estos factores, que actúan sobre la fase S del ciclo celular, ven dificultada su función pro-apoptótica debido a la detención en fase G1 provocada por la amilorida, inhibiéndose de este modo la apoptosis celular<sup>71</sup>.

Roepe ha propuesto una teoría integral en la que se rechaza la hipótesis habitualmente aceptada del bombeo extracelular de fármacos en células resistentes a diversos agentes quimioterapéuticos como principal mecanismo para explicar la RMD<sup>8, 18</sup>. Este autor expone que la patogénesis de la RMD está basada en alteraciones energéticas de la despolarización de la membrana celular y en su correspondiente elevación del pH<sub>i</sub>, un paradigma y enfoque conceptual que supera el hecho de que cualquier posible estructura particular o molécula específica sea en último lugar el principal mecanismo responsable e involucrado en la RMD ("paradigma trans- o meta-estructural"). Dichas alteraciones de los gradientes de concentración de hidrogeniones a través de la membrana celular recuerdan, por sus evidentes paralelismos, a la teoría quimiosmótica de Mitchell sobre los mecanismos finales de trasducción de energía (modelo para-Mitchelliano de la RMD)<sup>8, 18, 72, 73</sup>. Hallazgos similares relacionando directamente la elevación del pH citosólico con las alteraciones en la despolarización de la membrana celular de las células cancerosas resistentes, o RMD-positivas, han sido publi-

cados<sup>13, 14, 51</sup>. De igual manera, la expresión de la P-glicoproteína eleva el  $pH_i$ , siendo este cambio alcalino necesario, a la vez que suficiente, para prevenir la acumulación de fármacos quimioterapéuticos, un hecho que es independiente de la expulsión activa de dichos fármacos de la célula por otros mecanismos<sup>13, 18</sup>. Otros autores consideran que la P-glicoproteína actúa como una bomba de expulsión de hidrogeniones ATP-dependiente<sup>14</sup>. El hecho de que la actividad del transportador de la RMD induzca la alcalinización del citosol ha llevado a defender que dicho mecanismo se pueda considerar asimismo como una bomba expulsora de protones<sup>74</sup>. Finalmente, estos múltiples y concordantes hallazgos también encuentran su contrapartida en publicaciones que niegan que el  $pH_i$  afecte significativamente la expulsión de fármacos por la P-glicoproteína<sup>19, 75</sup>.

De igual manera, los transportadores de fármacos ATP-dependientes son muy importantes en el origen y causa de la RMD, mientras que las ATPases de transporte iónico están ayudando a clarificar aún más por qué las células tumorales consiguen mantener a los citotóxicos alejados de sus dianas<sup>76</sup>. Una bomba de membrana específica para los iones de hidrógeno es la  $H^+$ -ATPasa, cuya sobreexpresión provoca una disminución de la concentración intracelular de hidrogeniones, hecho que induce transformación celular y es causa directa de la carcinogénesis<sup>2, 3, 30, 31</sup>. Paralelamente, dicha bomba de hidrogeniones también está involucrada en la expulsión activa de compuestos antineoplásicos de células HL60 resistentes a la adriamicina y a la vincristina<sup>77</sup>. Inhibidores específicos de la  $H^+$ -ATPasa, como la bafilomicina  $A_1$ , también aumentan la acumulación intracelular de antineoplásicos merced a la inhibición del flujo de estos a través de un mecanismo acidificador directamente dependiente del ion  $H^+$ <sup>78, 79</sup>. En resumen, parece ser que cualquier mecanismo que eleve anormalmente el  $pH_i$ , esté mediado por el intercambio iónico entre  $Na^+$  y  $H^+$  a través de la sobreexpresión del antiportador  $Na^+/H^+$ , vía activación de la  $Na^+/K^+$ -ATPase, a través de un concierto sinérgico de ambos mecanismos (*coupling*)<sup>1, 56, 58, 80</sup>, o debido a la actividad excesiva de la  $H^+$ -ATPasa, contribuye a instaurar y/o mantener la RMD. Las importantes implicaciones para el tratamiento del cáncer que se deducen de estos hallazgos resultan tan obvios y evidentes que no requieren más consideraciones.

### La neovascularización en el crecimiento tumoral y el proceso metastático: factores promotores $Na^+/H^+$ -dependientes

El crecimiento de los tumores sólidos a partir de un determinado volumen, así como su invasividad y capa-

cidad metastática, dependen en gran medida de la inducción de nuevos vasos sanguíneos que aporten nutrientes, oxígeno y factores paracrinos a las células tumorales en expansión<sup>81</sup>. Este fenómeno, denominado angiogénesis o neovascularización, resulta fundamental para el desarrollo y progresión no sólo de los tumores sólidos, sino también de leucemias y otras enfermedades hematológicas<sup>82, 83</sup>.

La activación de la angiogénesis (*"angiogenic switch"*) es un complejo proceso, genética y microambientalmente regulado, en el que sobresalen oncogenes y factores angiogénicos (reguladores positivos) frente a genes supresores tumorales y factores anti-angiogénicos (reguladores negativos). Es también significativo que la actividad de algunos de estos oncogenes y factores angiogénicos esté estrechamente relacionada con el equilibrio ácido-básico intracelular. En este sentido, un considerable número de moléculas estimuladoras de la neovascularización y reguladores positivos de la angiogénesis ejercen sus efectos tendiendo a desviar, siempre en una misma dirección alcalinizante, la homeostasis celular ácido-básica (Tabla I). Dicha acumulación de datos, siempre en un mismo sentido y sin excepción alguna aún conocida, sugieren la existencia de una relación directa entre la estimulación angiogénica y el aumento del  $pH_i$ . Tal es el caso de la interleuquina-1 (IL-1), cuya actividad pro-inflamatoria ha sido extensamente documentada. La IL-1 estimula la neovascularización mediante la regulación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), tanto en células tubulares proximales<sup>84</sup> como en células tumorales de colon humano<sup>85</sup>. Esto es debido a la sobre-estimulación (*"upregulation"*) del complejo factor-receptor del VEGF-KDR/flt-1<sup>86</sup>. Esta misma citocina es responsable de la alcalinización del  $pH_i$  en células T mediante la activación del antiportador  $Na^+/H^+$ <sup>87</sup>. Precisamente, también en este contexto la actividad del intercambio  $Na^+/H^+$  aparece como el mecanismo principal por el cual estos y otros factores estimuladores de la angiogénesis alteran la regulación intracelular de hidrogeniones para inducir un aumento del  $pH_i$ <sup>88-90</sup>. Aun cuando queda por demostrarse la implicación de muchos otros reguladores positivos de la neovascularización en la homeostasis celular ácido-básica, el significativo número de factores descritos que sí lo hacen, tanto a nivel genético como microambiental, sugiere cierta asociación entre la estimulación de la angiogénesis, el antiportador  $Na^+/H^+$  y/o el  $pH_i$ <sup>83</sup>. Sin embargo, no hay que olvidar que otros mecanismos afectados por estimuladores o inhibidores del intercambio  $Na^+/H^+$ , como el activador de plasminógeno tipo urokinasa, pudieran ser asimismo responsables de diversos efectos terapéuticos sobre la neovascularización, ya sea tumoral, diabética, o de otra naturaleza<sup>91, 92</sup>.

TABLA I

### Efecto estimulador de diferentes moléculas peptídicas sobre la angiogénesis, los transportadores de membrana y la dinámica intracelular de hidrogeniones

(Orive G, Pedraz JL, Harguindey S. Angiogenesis and hydrogen ion (H<sup>+</sup>) dynamics: from pathogenesis to treatment. (ref. 142)

Factor	Efectos sobre la dinámica i.c. de hidrogeniones	
IL-1	↑ VEGF/VPF y la expresión de KDR/flk-1	↑ H <sup>+</sup> -ATPasa y APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
IL-8	↑ migración y proliferación de CE	↑ pH i.c. y el Ca <sup>2+</sup> citoplasmático libre
EGF	↑ síntesis de DNA, proliferación y migración de CE	↑ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
PDGF	↑ síntesis de DNA, proliferación y migración de CE	↑ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
G-CSF	↑ síntesis de DNA, proliferación y migración de CE	↑ pH <sub>i</sub> a través de ( APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
GM-CSF	↑ activación y el programa de diferenciación angiogénico	↑ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
TNF-α	↑ migración de CE	↑ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
HGF/SF	↑ supervivencia y proliferación tumoral	↑ pH <sub>i</sub>
TGF-β	↑ angiogénesis <i>in vivo</i>	↑ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
IGF-I	↑ migración de CE y la formación de túbulos	↑ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
Angiotensina II	↑ expresión génica y secreción de VEGF/VPF	↑ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
PGE <sub>2</sub>	↑ proliferación de CE	Induce alcalosis i.c.
Insulina	↑ proliferación de CE y la formación de túbulos	↑ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>

↑ : estimulación; CE: célula endotelial; pH<sub>i</sub>: pH intracelular; APA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>: actividad del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.

### Oncogenes y virus oncogénicos: experiencia concluyente y posible universalidad de fenómeno

Se conoce que la actividad de los oncogenes *v-mos* y *Ha-ras*, aparte de diversos factores de crecimiento, está funcionalmente mediada por la inducción de una elevación del pH<sub>i</sub> secundaria a la estimulación del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, condición que resulta *sine que non* para la activación desde protooncogen a oncogen activo<sup>20-22</sup>. Sin embargo, algunos de estos estudios fueron inicialmente criticados aduciéndose que dicha alcalinización no ocurría en condiciones fisiológicas, ya que otros sistemas de transporte de protones, como los antiportadores dependientes de bicarbonato, no habían sido tenidos en cuenta. A pesar de ello, incluso cuando los sistemas de transporte dependientes de bicarbonato están activados por la presencia de bicarbonato en el medio de cultivo, oncogenes como el *ras* inducen la necesaria y permisiva alcalinización citosólica, y así la transformación celular<sup>3, 20, 21</sup>.

En lo que respecta a la actividad viral, se conoce desde hace décadas que tanto la síntesis como los estadios tardíos de la replicación de ciertos virus cae drásticamente por debajo de un cierto pH microambiental<sup>93</sup>. En este sentido, el ácido láctico secundario a la casi patognomónica glicolisis anaerobia de los tumores malignos es un potente inhibidor de la replicación viral<sup>94, 95</sup>. Por el contrario, los pioneros trabajos de Rubin y Fodge demostraron que la alcalinización

celular inducida por virus u otros métodos estimulaba la glicolisis por medio de la activación del enzima llave de la glicolisis, la fosfofructoquinasa<sup>66, 96</sup>. Por otra parte, dicha estimulación es estrictamente necesaria como precursora de la síntesis de DNA. Estos mismos autores, después de comprobar que virus oncogénicos como el del poliovirus aumentaban el pH<sub>i</sub>, lo que precedía a la estimulación glicolítica y a su vez condicionaba la síntesis de DNA, llegaron a la conclusión de que un cambio ácido-básico alcalinizante era el mecanismo mediador por el cual el virus ejercía su acción transformadora y oncogénica<sup>96</sup>.

Más recientemente, un concluyente estudio en estas mismas líneas ha sido llevado a cabo por Reshkin y cols. con retrovirus<sup>3</sup>. Estos autores han demostrado el papel causal y específico de un aumento patológico del pH<sub>i</sub> en la transformación maligna mediada por el oncogen E7 del virus del papiloma humano (HPV) tipo 16. Su efecto directo es sobre los keratinocitos humanos, el huésped natural del HPV en la patogenia del carcinoma de cérvix. Dichas investigaciones muestran asimismo que la alcalinización celular es un acontecimiento muy temprano en la oncogénesis. Sin embargo, en este caso el cambio celular no se debe a la estimulación del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (isoforma NHE-1) por parte del retrovirus, sino más bien al aumento de la afinidad del locus intracelular de la regulación del NHE-1. Extraordinariamente significativo resulta el hecho de que la anulación de la alcalinización citoplas-

mática inducida por el retrovirus con el análogo de la amilorida DMA (5-(N,N-dimetil)amilorida) inhibe el desarrollo del fenotipo transformado, de los tumores en sí, y también de su desarrollo posterior. La conclusión más importante de estos estudios es que en la relación virus/pH<sub>i</sub>/antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, la alcalinización celular es un mecanismo clave y específico no sólo en la transformación oncogénica sino también en el desarrollo y mantenimiento del estado neoplásico, un hecho que es aplicable a diversos tumores sin importar el tejido de origen o la variabilidad genética<sup>3</sup>. A su vez, estos estudios aclaran una vieja polémica al confirmar que la otra característica específica de la malignidad, aparte de la elevación del pH<sub>i</sub>, es la desviación tumoral hacia un metabolismo glicolítico pH-dependiente<sup>3, 64, 67</sup>. Consideraciones concordantes las de estos autores sobre la existencia de idénticas alteraciones del equilibrio ácido-básico vaginal en la patogenia del carcinoma de cérvix han sido consideradas con anterioridad<sup>32, 35, 36</sup>. Para una más extensa revisión de otros paralelismos básico-clínicos en estas áreas, así como sobre el papel de cambios crónicos y medioambientales de esta misma naturaleza en la etiopatogénesis de las neoplasias de las diferentes superficies epiteliales del organismo humano, ver refs.<sup>1, 30, 67, 97-99</sup>.

### **Ventajas estratégicas de la dinámica tumoral: un orden dentro del caos**

La principal característica energética deducida de la evidencia científica atesorada hasta el momento enseña que, desde un punto de vista termodinámico y energético de una naturaleza transestructural y para-Mitchelliana<sup>8, 18, 72</sup>, las células malignas contienen los principales mecanismos responsables de su funcionamiento anómalo y crecimiento incontrolado en la interfase representada por la membrana celular. La evidencia acumulada permite comprender las ventajas termodinámicas H<sup>+</sup>-dependientes con las que cuentan las células y tumores malignos. Estas son: A) contribuir a la pérdida del balance alcalino como causa inicial y específica de la transformación neoplásica<sup>1-3</sup>; B) mantener el estado proliferativo mediado por un elevado pH<sub>i</sub><sup>3</sup>; C) configurar una estrategia antiapoptótica por medio de diversos mecanismos anti-acidificantes (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, etc)<sup>25, 40, 68, 100</sup>; D) conformar un escudo de defensa anti-quimioterapéutico (RMD); y finalmente, E) aislarse funcional y biológicamente del resto del organismo del huésped<sup>1, 97, 101</sup>. La última de dichas características permite la consideración de otra regla de oro de las estructuras malignas: el hecho de conformar genuinas "islas biológicas" dentro del organismo a través de un organizado sistema de autoprotección basado

en una ventajosa manipulación de la dinámica del ion hidrógeno. Esto les permite ser inmunes a todo ataque quimioterapéutico externo bajo la mayor parte de las circunstancias<sup>1, 14</sup>.

Dicha estrategia dinámica permite comprender que el propósito del metabolismo, la bioquímica y los sistemas energéticos específicos de las células cancerosas es tener a los diferentes mecanismos de membrana dispuestos como bombas energéticas que actúan, literalmente, "todo el tiempo y a toda máquina"<sup>1</sup> para mantener un permanente desequilibrio homeostático ácido-básico. Esta estrategia energética es utilizada por las células neoplásicas para mantener un elevado pH intracelular y protegerse de ese modo de un medio interno tumoral extracelular, intersticial y microambiental mucho más ácido y potencialmente tóxico<sup>1, 14, 50, 51, 62</sup>. Los tejidos malignos, en su indiferenciación evolutiva<sup>101</sup> conforman de esta manera una política de *sistema cerrado H<sup>+</sup>-dependiente*, autónomo y autoprotector, a modo de una estrategia maligna, pero intencionada y predeterminada, y en ese sentido, inteligente. Desde cualquier perspectiva que se enfoque –energética, bioquímica, metabólica y/o biológica– dicho plan permite a los tumores malignos vivir independientemente del huésped parasitado, al mismo tiempo que constituir un escudo impenetrable a cualquier tipo de agresión terapéutica externa, al menos mientras no se modifiquen las condiciones existentes rígidamente predeterminadas por la dinámica específica de una fisiopatología maligna tan anómala.

## **2. La otra cara de la moneda - Regresión y Tratamiento**

Considerando ahora el extremo opuesto, y superior, del espectro de concentración intracelular de hidrogeniones [H<sup>+</sup>] i. c., zona limítrofe de [H<sup>+</sup>] elevada o pH ácido, se hace fundamental analizar qué factores inducen a la homeostasis y fisiología celular hacia una acidificación específica con fines terapéuticos, y cómo estas condiciones y tendencias dirigen, ya sea directa o indirectamente, hacia la opción de un tratamiento oncológico cada vez más selectivo.

### **Apoptosis selectiva en el tratamiento del cáncer. Vías e intentos terapéuticos**

Resulta extraordinariamente significativo el hecho de que una gran variedad de compuestos que se han mostrado capaces de inducir apoptosis en muchos y muy diferentes tipos de células malignas, fármacos como la interleukina 2 (IL-2), LAK, verapamil, lovastatina, bafilomicina A1, estaurosporina, amilorida y sus deri-

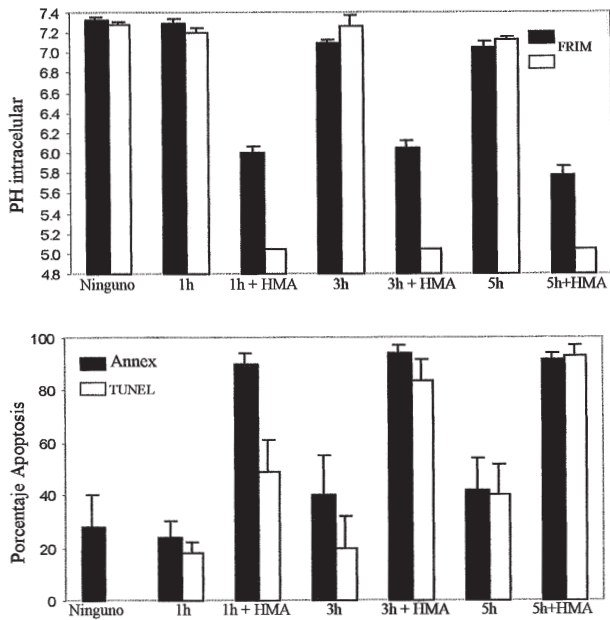


Fig. 2A y 2B. Efecto de HMA sobre el pH<sub>i</sub> y la apoptosis de células de leucemia linfoblástica aguda. (A) Medida del pH<sub>i</sub> por FRIM y citometría de flujo. (B) Estimación de apoptosis por técnicas de anexina-V-FTIC y TUNEL. (Rich IR, Worthington-White, OA, Musk P. Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. Blood 2000;95:1427-1434. Reproducido con permiso de la revista Blood).

vados, nigericina, DIDS, BCG, etc., hayan sido considerados, sin excepción, inductores de muerte celular apoptótica por medio de una acidificación celular. Destaca asimismo que este fenómeno haya sido sistemáticamente achacado, para todos y cada uno de esos factores por separado, a la inhibición del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup><sup>42-45, 97</sup>. Los ya mencionados hallazgos de Rich y cols. sobre la existencia de una "alcalosis maligna" extrema en varios tipos de leucemias humanas<sup>11</sup> han demostrado que el tratamiento con el potente y específico inhibidor del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> HMA [5-(N,N-hexametylen)amilorida] es capaz de disminuir dichos pH<sub>i</sub> patológicamente elevados en los diversos tipos de leucemias humanas estudiadas, haciéndolos caer incluso a niveles tan bajos como pH<sub>i</sub>: 5.0 en el caso de la leucemia linfoblástica aguda (ALL)<sup>11</sup> (Fig. 2A). Dichos experimentos también han mostrado una muy significativa sensibilidad diferencial y selectiva del efecto pro-apoptótico del HMA sobre las células leucémicas cuando se comparan con células hematopoyéticas normales. Estos autores han demostrado asimismo que la inducción de una acidificación por debajo de

un pH<sub>i</sub> de 6.8 en células leucémicas por dosis farmacológicas de HMA mata selectivamente a estas células en un porcentaje que supera el 90% (Fig. 2B). Tanto éstos como otros experimentos en la misma línea parecen coincidir en que un pH<sub>i</sub> < 6.8 constituye el umbral y punto crucial (*the turning point*) por debajo del cual se facilita la inducción de una activación "natural" de una reacción en cadena mediada por proteasas, caspasas y endonucleasas que finalmente produce una apoptosis celular tumoral selectiva<sup>102-109</sup>.

La inducción de un profundo medio ambiente intracelular ácido ha sido considerado como el proceso que dispara el comienzo de la apoptosis de las células leucémicas merced a una sobrerregulación estimuladora (*up-regulation*) de la expresión de la proteína proapoptótica Bax. Este mecanismo parece estar mediado por la activación de las caspasas ICE o CPP32, lo que conduce irreversiblemente a la apoptosis inducida por un estrés ácido, y por consiguiente al control de la proliferación celular y a la detención del crecimiento tumoral<sup>110, 111</sup>. De forma similar, la activación de una proteasa parecida a la ICE y la fragmentación de DNA son fenómenos precedidos por una disminución del pH<sub>i</sub> durante la apoptosis en líneas celulares dependientes de IL-3<sup>109</sup>.

Por el contrario, si se considera la resistencia a la inducción de la apoptosis tumoral (anti-apoptosis), la inducción de una muerte apoptótica puede inhibirse ya sea por un aumento directo del pH<sub>i</sub> por medio de alcalinizantes celulares, como la cloroquina, el imidazol, el glutatión, etc., o a través de la sobreexpresión del producto génico antiapoptótico Bcl-2, un factor esencial en la resistencia a fármacos antineoplásicos<sup>25, 68, 112-114</sup>. Este producto génico, así como el Bcl-x<sub>L</sub>, aumentan el pH<sub>i</sub> citosólico y de esta forma previenen la acidificación inducida por la estaurosporina, el v-abl, el factor de estimulación de los granulocitos (FSG), y al parecer también por la edelfosina, compuesto que también inhibe el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup><sup>15, 23, 24, 68, 114-116</sup>. En definitiva, cualquiera que sea el caso y sistema estudiado, la vía común para resistir la inducción de una apoptosis terapéutica en todos ellos está mediada por una variedad de diferentes mecanismos que, o bien previenen la acidificación celular o bien elevan el pH<sub>i</sub> citosólico y/o activan el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup><sup>23, 68, 100, 104, 105</sup>. De esta manera se hace fácilmente comprensible por qué la estimulación del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> inhibe la apoptosis<sup>117</sup> mientras que su inhibición la induce<sup>45</sup>.

A pesar de que sea reconocido ampliamente que la acidificación es un fenómeno universal durante el proceso apoptótico<sup>11, 44, 45, 53, 62, 108-119</sup>, es justo reconocer de igual manera la existencia de alguna publicación

aislada en sistemas diversos sugiriendo desde que la relación acidificación-apoptosis no es convincente<sup>120</sup> a incluso el fenómeno contrario<sup>121</sup>. En lo que aún existe cierta controversia es si dicho cambio ácido-básico ocurre en estadios tardíos de un proceso de muerte celular favorecedor de la degradación de las DNAsas, que a su vez degradan el DNA genómico, o si dicho cambio es temprano y predeterminante. Esto induce la pregunta clave: si la acidificación es causa o consecuencia del proceso apoptótico, y si ocurre cuando la decisión de muerte celular ya ha sido determinada irreversiblemente por otros mecanismos anteriores, como las lesiones en el DNA, alteraciones del huso acromático, etc., o no<sup>107, 122</sup>. En este sentido, Angioli y cols. han demostrado que la acidificación del citosol en la apoptosis mediada por retinamida en células leucémicas es un fenómeno muy temprano<sup>108</sup>. De igual manera, Matsuyama y cols. han mostrado que la acidificación del pH citosólico es asimismo un acontecimiento temprano que regula la activación de caspasas<sup>111</sup>. Estos hallazgos están de acuerdo con los de Furlong y cols., en los que la disminución del pH citosólico precede la activación de la fragmentación del DNA inducida por proteasas del tipo ICE<sup>109</sup>. Otros grupos han llegado a conclusiones similares<sup>15, 105, 112, 116, 119</sup>.

En cuanto a la terapéutica, la apoptosis específica en células neoplásicas, desde la leucemia promielocítica aguda al hepatocarcinoma, puede ser inducida estimulando la actividad de la caspasa-3 por medio de acidificación inducida por inhibidores del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ya sea con amilorida o por otros métodos asimismo estimuladores de la proteína Bax, u otros mecanismos paralelos<sup>24, 43, 45, 110, 123-125</sup>. Hay que resaltar que, lamentablemente, potentes inhibidores del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de reciente incorporación, como el cariporide (HOE-642) y similares, se hallan aún a la espera de ser ensayados como compuestos antineoplásicos potenciales selectivos.

El hecho de que otros inductores de la apoptosis selectiva de las células cancerosas, como la edelfosina (ET-18-OCH<sub>3</sub>)<sup>106</sup>, interfieran asimismo con la actividad del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ha llevado a Besson y cols. a deducir que la acidificación artificial mediada por la inhibición del intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , y la consecuente retención intracelular de iones  $\text{H}^+$ , participa activamente en la acción de dicho compuesto, aunque ello no descarta otros posibles mecanismos de acción<sup>115</sup>. De forma paralela, otros tipos de agentes inductores de una apoptosis específica, como el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC), son capaces de inducir la apoptosis selectiva de células neurales transformadas, así como regresiones clínicas de tumores cerebrales en ratas<sup>126</sup>. Esto se ha achacado a una acumulación de ceramida, lo que, en

aparición paradójicamente, origina una elevación transitoria del  $\text{pH}_i$ , modificando así la conformación de Bax y precediendo la apoptosis<sup>126</sup>. Sin embargo, estudios complementarios de estos mismos investigadores<sup>127</sup>, demuestran que los cannabinoides estimulan la cetogénesis en astrocitos, un mecanismo colateral, asimismo acidificador, que durante muchos años ha sido reconocido por su efecto citotóxico sobre células cancerosas de diversas estirpes<sup>98, 128-131</sup>.

### Antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ y $\text{pH}_i$ en la inactivación de oncogenes y virus oncogénicos

La transformación carcinogénica mediada por algunos de los oncogenes más frecuentes en el cáncer humano puede ser bloqueada por los efectos acidificadores de la amilorida y/o sus derivados o, simplemente, previniendo una alcalinización celular<sup>132</sup>. En este sentido, la activación de los oncogenes *v-mos* y *Ha-ras* eleva el  $\text{pH}_i$  por medio de la estimulación del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , provocando el inicio de la fase S del ciclo celular y la síntesis de DNA. Lo más significativo es que este fenómeno puede ser completamente contrarrestado previniendo el brote alcalino con amilorida<sup>20-22, 60-61, 96, 132</sup>. Esto ha llevado a sugerir la utilización clínica de fármacos de la serie amilorida en tumores dependientes de la expresión de estos oncogenes<sup>133</sup>. Finalmente, los efectos inhibitorios, antitumorales y a su vez disminuidores del pH celular (*zona ácido-básica inferior*) de la amilorida y/o sus derivados, así como, en el lado opuesto, los efectos carcinógenos de elevaciones indebidas de pH citosólico (*zona ácido-básica superior*), tanto en estudios celulares básicos (*interiores*) como en las diversas situaciones clínicas (*exteriores*), han sido extensamente revisados en otras publicaciones<sup>1, 30, 134</sup>.

Otras posibilidades terapéuticas surgen de los recientes y ya citados hallazgos de Reshkin y cols. con HPV. Estos autores han demostrado que la anulación de la alcalinización citoplasmática inducida por el análogo del amiloride DMA [5-(N,N-dimetil)amiloride] inhibe el desarrollo del fenotipo transformado, el crecimiento tumoral de carcinoma de cérvix y su desarrollo posterior<sup>3</sup>. Estos hallazgos, junto al hecho de que la replicación viral, tanto en la síntesis como en estadios más tardíos, caiga drásticamente por debajo de un cierto pH microambiental<sup>93-95</sup>, hace que estos conceptos también hayan de ser tenidos muy en cuenta en todo futuro estudio sobre mecanismos íntimos de actuación de otros retrovirus como el VIH. Esta línea sugiere la potencial importancia de estudios básicos sobre los efectos de infección de HIV en el equilibrio homeostático y ácido-básico intracelular<sup>3</sup>.

## El pH<sub>i</sub> en el tratamiento de la resistencia a fármacos antineoplásicos (RMD): potencial y significado

Una gran variedad de compuestos utilizados para revertir la resistencia a fármacos antineoplásicos, desde el verapamil a la amiodarona, la bafilomicina A<sub>1</sub>, la ciclosporina A, el tamoxifen, el DIDS, la nigericina, la edelfosina, la amilorida y sus derivados, etc., disminuyen significativamente el pH celular<sup>8, 13, 14, 17, 44, 45, 100, 105, 106, 119, 134-137</sup>. En todos y cada uno de estos estudios se ha considerado que el mecanismo mediador de la reversión o superación de la RMD es la hiperacidificación celular inducida por la utilización de cualquiera de estos fármacos. Un ejemplo clave de este problema es la relación inversa entre el pH citosólico y la acumulación intracelular de doxorubicina en células de cáncer de pulmón humano (Fig. 1). Asimismo, la disminución del pH<sub>i</sub> sensibiliza a las células cancerosas de diversas estirpes tanto a la apoptosis como a la quimioterapia y a la hipertermia<sup>13, 14, 110, 119, 138, 139</sup>. Curiosamente, la única publicación que ha mostrado resultados negativos en la superación de la RMD con derivados del amiloride no contiene estudios complementarios sobre un posible efecto sobre el pH celular en dicho sistema en particular<sup>19</sup>. Por el contrario, la reversión de la RMD ha sido conseguida mediante la acidificación obtenida por inhibidores del intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> como la amilorida, o sus análogos más potentes, en una amplia variedad de situaciones<sup>14, 16, 17, 134</sup>.

La inhibición del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> no solo aumenta de forma llamativa la sensibilidad tumoral a diversos agentes quimioterapéuticos, como el cisplatino, la adriamicina, el paclitaxel (S. J. Reshkin, comunicación personal), etc., sino que también afecta positivamente a los factores de especificidad y *ratios* terapéuticas tanto en hepatomas como en otros tumores malignos<sup>1, 53, 119, 124, 125, 136</sup>. El hecho de que la inhibición del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> sea capaz de causar una disminución del pH<sub>i</sub> incluso por debajo del de las células de origen, que incluso pueden verse no afectadas, indica cierta selectividad terapéutica<sup>3, 140</sup>.

En cuanto a posibles aplicaciones terapéuticas de estos conceptos es importante apuntar que si la alcalinización celular aumentaba la resistencia a la adriamicina hasta 2000 veces en células de cáncer de pulmón humano<sup>14</sup>, el fenómeno contrario, obtenido al imponer un gradiente transmembrana de pH de 2.9 (ácido dentro), logra que la concentración intracelular de doxorubicina se multiplique al menos por 100<sup>141</sup>.

Por último, la actividad alcalinizante de la H<sup>+</sup>-ATPasa, cuya misión es bombear protones fuera de la célula, está también involucrada en el flujo de fármacos antineoplásicos por medio de la paralela expulsión de

iones H<sup>+</sup><sup>2, 76, 77, 119, 141</sup>. Esta forma alternativa de inducción de una alcalinización celular permite integrar dentro del mismo modelo el hecho adicional de que los inhibidores específicos de la H<sup>+</sup>-ATPasa, como la bafilomicina A<sub>1</sub>, induzcan la acumulación intracelular y la citotoxicidad de diversos antineoplásicos como la doxorubicina<sup>14</sup>, el cisplatino<sup>119</sup>, e incluso induzcan la apoptosis tumoral<sup>78, 79</sup>. Por el contrario, la elevación del pH<sub>i</sub> confiere resistencia al cisplatino<sup>119</sup>. Evidencia adicional proviene de que la estimulación de la H<sup>+</sup>-ATPasa por G-GSF previene la acidificación celular, anulando así la apoptosis, mientras que su inhibición por bafilomicina A<sub>1</sub> la estimula<sup>116</sup>. En resumen, toda la evidencia existente indica que cualquier intento futuro de superación de la RMD debería de ser asimismo enfocada inicialmente desde una perspectiva y dinámica de desequilibrio ácido-básico, ya que es evidente más allá de duda alguna que su reversión puede ser conseguida, en diversos sistemas y por diferentes métodos, merced a los efectos mediadores de una disminución del pH<sub>i</sub> en las células y tumores malignos<sup>8, 13, 14-18, 46, 119</sup>.

## Neovascularización, proceso metastático y antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

La relación directa entre la estimulación de la neovascularización y una tendencia a la alcalinización celular no solo se produce en el contexto de la etiopatogénesis sino, del mismo modo, y en lo que se refiere al tratamiento, en la situación opuesta. Es decir, parece existir una relación directa entre la anti-angiogénesis, o inhibición de la neoformación y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, con una dinámica "ácida" de la concentración del H<sup>+</sup> intracelular. En este sentido, se han hallado numerosos fármacos antiangiogénicos que afectan negativamente la función del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, la H<sup>+</sup>-ATPasa, o incluso inducen al pH<sub>i</sub> hacia la acidificación<sup>142</sup> (Tabla II).

A pesar de que los efectos farmacológicos de estos principios activos sean muy variados, en todos los fármacos aquí descritos, en los que la relación pH/angiogénesis ha sido considerada, el mecanismo de acción de todos ellos es mediado, una vez más, por la inhibición de la actividad del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. Tal es el caso del captoprilo, la edelfosina, la suramina o la squalamina. Este último compuesto, por ejemplo, inhibe selectivamente la neoformación de nuevos plexos vasculares y bloquea el flujo de H<sup>+</sup> en células endoteliales, inhibiendo la alcalinización y la proliferación de las mismas<sup>143</sup>. No obstante, en algunos casos como en el de la suramina, el mecanismo de acción específico no ha sido totalmente aclarado, aunque se postula que tanto éste como otros fármacos análogos ejercen asimismo mecanismos de acción pH-dependientes<sup>144</sup>.

TABLA II

**Fármacos inhibidores de la angiogénesis que a su vez bloquean el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>**(Orive G, Pedraz JL, S Harguindey. Angiogenesis and hydrogen ion (H<sup>+</sup>) dynamics: from pathogenesis to treatment. (ref. 142)

Factor	Efectos sobre la angiogénesis	Efectos sobre la dinámica i.c. de hidrogeniones
SURAMINA	↓ Ang. y crecimiento tumoral	↓ H <sup>+</sup> -ATPasa
SQUALAMINA	↓ Ang. y crecimiento tumoral	↓ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
WARFARINA	↓ síntesis de prostaglandinas	Acidificación del citoplasma
SULINDAC	Induce apoptosis and ↓ Ang. tumoral	Interactúa con los H <sup>+</sup> de la intermembrana
GENISTEINA	↓ tirosina kinasa, proliferación y migración de CE y el μPA	↓ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
CAPTOPRIL	↓ Ang.	↓ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> ;
AMILORIDA	↓ μPA	↓ APA (NHE-1)
EDELFOFINA	↓ Ang.	↓ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>
PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	↓ crecimiento de CE y Ang.	↓ recuperación del pH;
STAUROSPORINA	↓ Ang.	↓ APA Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup>

CE: célula endotelial; μPA: activador plasminógeno de urokinasa; APA Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>: actividad del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>; ↓: Inhibición; Ang: Angiogénesis; NHE-1: antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-isoforma 1.

En cuanto al tratamiento oncológico, al menos en lo que afecta a la inhibición de la neovascularización tumoral, algunos de estos compuestos son de fácil aplicabilidad clínica en un intento de detener el proceso metastático mediado por la angiogénesis tumoral (Tabla II). Entre ellos hay que considerar al menos: A) la edelfosina<sup>145, 146</sup>; B) el captopril<sup>147</sup>; C) diversos compuestos de la serie amilorida<sup>32, 148</sup>; D) la squalamina<sup>149</sup>; y E) los flavonoides tipo quercitina<sup>150</sup>. Así, la amilorida y sus derivados más potentes han sido considerados como muy efectivos, tanto en el tratamiento de la neovascularización tumoral como en la de la retinopatía diabética crónica y proliferativa<sup>91, 151</sup>. Muy significativamente, Kellen y cols. lograron un efecto antimetastático completo en tumores transplantados de mama utilizando únicamente amilorida<sup>92</sup>. La amilorida, aparte de inhibir la actividad del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> subtipo 1, bloquea el activador de plasminógeno tipo uroquinasa y su receptor (μPA/μPAR)<sup>152</sup>. Contribuye de este modo a inhibir la degradación proteolítica de la matriz extracelular, una etapa fundamental tanto para la migración de células endoteliales en la formación de vasos sanguíneos como en la migración de células tumorales en su determinación metastatizante.

En definitiva, la evidencia acumulada en el estudio de la neovascularización tumoral apunta a dos conclusiones significativas. Por un lado refuerza la idea de que la alcalinización inducida por el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> es un evento inicial en la transformación maligna y posterior desarrollo tumoral, tal como ha sido publicado recientemente<sup>3</sup>, y por otro apoya el hecho de que fármacos inhibidores del intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

puedan influenciar significativamente en la evolución clínica y en la terapéutica adyuvante y/o neoadyuvante del proceso metastático en diversos tumores humanos y en diversas situaciones clínicas. En este sentido, un caso de curación aparente de carcinoma de ovario metastático merced a tratamiento crónico con amilorida, ya sea como inhibidor del antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> o como inhibidor del activador de plasminógeno tipo urokinasa, ha sido recientemente publicado<sup>153</sup> (Fig. 3).

### Regresión espontánea del cáncer y mecanismos ácido-básicos (REC)

Casi desde principios del siglo XX, diferentes procesos o situaciones que tienen en común una profunda y sostenida acidificación microambiental y/o sistémica obtenida por diferentes métodos y procedimientos y el reconocido fenómeno de la regresión espontánea de diferentes tipos de neoplasias, tanto en animales como en seres humanos, han sido íntimamente asociados en una relación causa-efecto. Tan pronto como en 1931, el clásico tratado de Oncología de Meyer achacaba a la inducción de una acidosis, desde local a sistémica, como el mediador esencial de la acción curativa de las toxinas de Coley y del proceso febril<sup>154</sup>. Con anterioridad incluso, Reding and Slosse habían llegado a las mismas conclusiones<sup>155, 156</sup>. La favorable influencia de la acidificación sobre la regresión del cáncer, espontánea o inducida, y curación de una multiplicidad de tumores animales transplantados ha sido reconocida de igual manera durante muchos años<sup>157-162</sup> (para una revisión ver ref. 158). Hace ya décadas, Anna Goldfeder

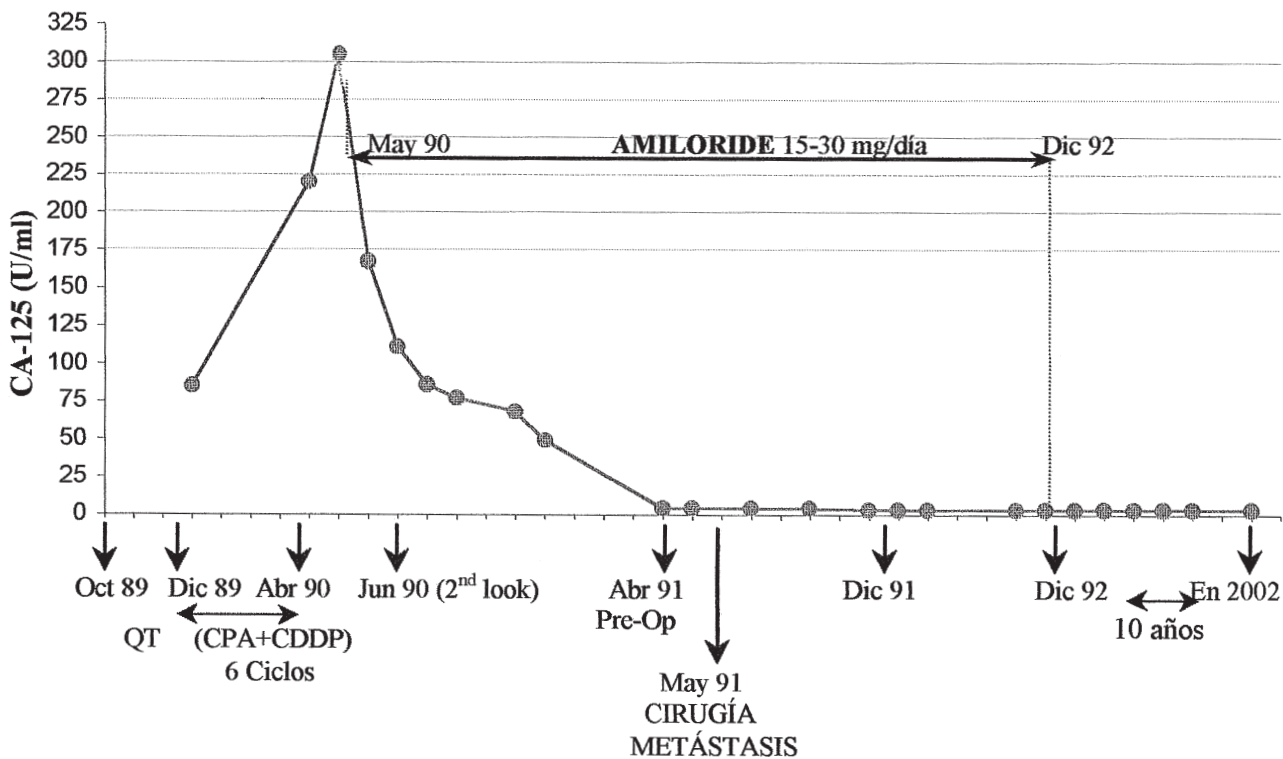


Fig. 3. Evolución clínica y química (CA-125) de un paciente con carcinoma de ovario metastático tratado crónicamente con amilorida. (Para más detalles ver ref. 153.)

ofreció una racionalización del tratamiento acidótico de las neoplasias<sup>159</sup>. Anghileri, utilizando cloruro amónico<sup>157</sup>, Verne y Roth con ácido acético<sup>161</sup>, Selawry con ácido láctico<sup>163</sup>, y otros mediante ácido clorhídrico<sup>160</sup>, repetidamente consiguieron regresiones y curaciones completas de una multiplicidad de tumores transplantados. Severas acidosis sistémicas inducidas por procedimientos quirúrgicos como la ureterosigmoidostomía han sido asimismo consideradas como el mecanismo esencial mediador en las regresiones "espontáneas" de diversos cánceres en seres humanos<sup>164</sup>. Para una más extensa consideración de este tema y algunos de los mecanismos involucrados en la, así llamada, regresión "espontánea" del cáncer, ver refs. 165-168.

### Implicaciones en ensayos clínicos designados a inducir apoptosis selectiva y superar la resistencia a agentes citotóxicos, solos o en combinación. Conclusiones generales

Algunas revisiones sobre pH tumoral solamente logran, debido a una falta de conceptos claros y crite-

rios discriminativos, aumentar el grado de confusión<sup>65</sup>. Es necesario constatar asimismo la existencia de graves errores y malinterpretaciones en algunos de los campos de investigación bajo estudio, publicados incluso en revistas científicas de primera línea<sup>169</sup>. Errores de este tipo afectan muy negativamente la comprensión de fenómenos como la RMD, la apoptosis, la quimioterapia, etc., confundiendo de esta manera muy negativamente el presente y futuro del tratamiento del cáncer y la práctica oncológica en general. Dicha falta de entendimiento puede influir también de manera negativa, así como comprometer significativamente, líneas correctas del desarrollo de áreas enteras de investigación oncológica designadas a encontrar formas de tratamiento menos tóxicas y más específicas. En este sentido, refiriéndose a la interpretación de los pioneros estudios de Simon y cols. sobre la existencia de una relación inversa entre  $pH_i$  y RMD<sup>13</sup>, Preisler los malinterpreta completamente para afirmar que es una *disminución* del  $pH_i$  lo que acompaña a la RMD<sup>169</sup>. Leyendo en sentido contrario los resultados mostrados por dichos autores, Preisler propone que la *acidificación celular* puede jugar un papel directo en la inducción de RMD. Este autor concluye erróneamente que

una reducción del pH celular, sin importar la causa, resultará en un aumento de la resistencia a una variedad de agentes citotóxicos. Es evidente que una concienzuda interpretación de los datos aseguibles de la literatura en el campo de la RMD hace obvio que, desde un punto de vista científico, lo único que sería cierto es la interpretación opuesta<sup>1-4, 8, 11, 13, 14, 18</sup>.

Paralelamente, la mayor parte de las más recientes y completas revisiones sobre el papel de la apoptosis en el cáncer, incluso abarcando el campo de la actividad de oncogenes, genes supresores, progresión tumoral, vigilancia inmunológica y resistencia al tratamiento, completamente ignoran cualquiera de los factores, hasta cierto punto más universales y sencillos, así como accesibles a un entendimiento más profundo, puestos de relieve en este trabajo<sup>102</sup>. Lo cierto es que cualquier agente acidificador de la célula, tales como los inhibidores del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la serie amilorida (HMA, etc.), que ya son selectivamente citotóxicos por sí mismos<sup>11</sup>, funcionan sinérgicamente con inhibidores de la ATPasa y otros agentes disminuidores del pH. Es por ello por lo que tienen el potencial de ser utilizados tanto como agentes antiproliferativos por sí mismos o como potenciadores de otras formas de quimioterapia, aparte de en la superación de la resistencia a citotóxicos y de la neovascularización tumoral, y también como inhibidores del proceso metastático y fomentadores de la apoptosis tumoral<sup>39, 69, 79, 170</sup>. A tenor de la evidencia preclínica y clínica existente hoy en día, se considera que esta es más que suficiente para aconsejar la programación de estudios clínicos prospectivos en el tratamiento adyuvante y neoadyudante de diversos tumores en seres humanos utilizando fármacos, solos o en combinación, tales como la amilorida y derivados<sup>153, 170, 171</sup>, la edelfosina<sup>145-146</sup>, el captopril<sup>147</sup>, la squalamina<sup>149</sup>, y ciertos bioflavonoides<sup>150</sup>.

Una concienzuda integración jerárquica de los datos disponibles en la actualidad en los diferentes campos oncológicos aquí supervisados conjuntamente aconseja, sea cual sea el sistema que se considere bajo estudio, desde la neovascularización a la MDR y desde el proceso metastático a la apoptosis selectiva, dirigir la atención de forma primordial a los cambios en las dinámicas del ion de hidrógeno celular<sup>3, 14-37</sup>. En este sentido un cambio radical de percepción es preceptivo si lo que se busca es poder acceder a un paradigma más comprensivo y omniabarcante en el estudio e investigación oncológica en general, y de ahí a un tratamiento de las enfermedades neoplásicas más comprensivo, racional y completo, a la vez que más específico y menos tóxico.

A tenor de la experiencia y evidencia acumulada,

un parámetro del metabolismo tan general como la dinámica de la concentración de  $\text{H}^+$  en el cáncer, se ha convertido, paradójicamente tal vez, en uno altamente "específico y patognomónico" en el entendimiento de la naturaleza íntima de la degeneración neoplásica, afectando de manera directa y fundamental a los principales campos de investigación, tanto en oncología básica como clínica. El papel altamente significativo de las dinámicas "elevadas" (alcalinas) y "bajas" (ácidas) así como "interiores" (básicas) y "exteriores" (clínicas) - los llamados "cuatro cuadrantes/cuatro niveles" - de la homeostasis celular, ya sea en el desarrollo, mantenimiento y progresión del estado neoplásico en primer lugar, y en segundo lugar en mejorar la especificidad y selectividad de los diferentes enfoques y áreas del tratamiento del cáncer, es hoy en día un área de creciente interés en múltiples campos de investigación como los aquí considerados. En este trabajo tan sólo hemos tratado de integrar, racional y jerárquicamente, la evidencia existente sobre un hecho incontrovertible: que un mismo y único tipo de alteración fisiopatológica es tan esencial como inicialmente responsable tanto de la transformación oncogénica como del mantenimiento del estado de actividad neoplásica y de la progresión tumoral<sup>1-3</sup> y, finalmente, de la resistencia a la terapia farmacológica y a la apoptosis.

Prácticamente toda la bioquímica y biología actuales indican la necesidad de un cambio cualitativo de enfoque, tal vez como único camino que permita saltar a un nuevo paradigma conceptual, más científico y comprensivo, en el estudio y la comprensión sistemática de la degeneración maligna. Esta actitud parece mostrarse a su vez como una vía nueva que hace factible una integración sinérgica, jerárquica y sintética de una inmensa y creciente cantidad de datos y hallazgos desperdigados e inconexos obtenidos hasta la fecha junto a los nuevos avances sugeridos por todo el cuerpo de la investigación moderna del cáncer.

El conjunto de hechos sintetizados en este trabajo ofrece un nuevo modelo de percepción, que hemos llamado transestructural o energético, que lleva a perspectivas más integrales basadas en la existencia de mecanismos cruciales, en ocasiones extremadamente complejos, de una íntima naturaleza ácido-básica<sup>41</sup>. La dinámica intracelular del ion hidrógeno se ha convertido en una herramienta extraordinariamente útil como base de un prometedor modelo y enfoque integral que dirige hacia el hallazgo de formas de tratamiento más específicas, selectivas y menos tóxicas. Las elevaciones sostenidas del pH celular en las células cancerosas, tanto como los cambios crónicos microambientales que preceden sistemáticamente a las neoplasias de las mucosas epiteliales del organismo, resumen

el fracaso global de la regulación medioambiental y homeostática de la dinámica del ion hidrógeno a los diversos niveles fisiológicos, desde los moleculares a los clínicos.

Los aspectos ácido-básicos pertinentes que afectan la apoptosis específica y la lucha contra la RMD han de ser considerados en la práctica como una posibilidad terapéutica real. La perspectiva aquí expuesta ha transformado a la concentración de H<sup>+</sup> en un blanco clave en la terapéutica oncológica, tanto en tumores sólidos como en leucemias<sup>1, 3, 11, 14, 40, 69, 125, 136, 172</sup>. Bajo la dinámica de este modelo conceptual se posibilita asimismo un mayor acercamiento entre las más variadas disciplinas, desde la bioquímica y la biología molecular a la inmunología del cáncer (LAK, BCG, TNF, IFN-Gama)<sup>100, 173-175</sup>.

Un enfoque estratégicamente global de la homeostasis ácido-básica celular en el estudio del cáncer ha de incluir una estructuración jerárquica que va desde su perspectiva bioenergética<sup>8, 18, 52, 54, 72, 101</sup> a la bioquímica<sup>64, 66, 96</sup>, al metabolismo intermediario<sup>67, 97, 98</sup> y a la situación clínica<sup>32-37, 134, 153</sup>. Una perspectiva integral de este tipo ha de conducir necesariamente a una comprensión cada vez más amplia y profunda de los mecanismos patogénicos finales, tanto como a una más efectiva exploración terapéutica en terapia antitumoral.

Dicha aproximación permite enfocar bajo un mismo marco parte del entramado de unas pobremente interrelacionadas áreas de la investigación y tratamiento del cáncer<sup>117, 178</sup>, un hecho que está comenzando a incidir en el tratamiento de diferentes tipos de neoplasias en seres humanos<sup>179</sup>. Representa asimismo un modelo inclusivo capaz de acceder a un mejor entendimiento de los, por otra parte demasiado complejos, procesos oncogénicos, haciéndolo simultáneamente a tres niveles: básico, preclínico y clínico. Finalmente, toda tendencia hacia un enfoque integral y unitario se dirige a proporcionar la posibilidad de desarrollar nuevas intuiciones en lo que se refiere a las relaciones íntimas e intercambio funcional entre factores genéticos (transcripción genética) y medioambientales (dietéticos, carcinógenos químicos, etc.).

A modo de conclusión general de carácter epistemológico se deduce que las tendencias dominantes en la investigación científica actual se hallan principalmente dirigidas a la obtención de nuevos datos analíticos y tecnológicos. Esta mentalidad conlleva el peligro de deslizarse hacia un excesivo grado de reduccionismo y fragmentación. Dicho desequilibrio necesita ser continuamente compensado por un esfuerzo integrador hacia cosmovisiones más amplias, intuiciones más profundas y deducciones que aspiren a modelos per-

ceptivos y paradigmas científicos cada vez más sintéticos y acogedores de la totalidad<sup>171</sup>. Un exagerado énfasis en el descubrimiento de un creciente número de datos se convierte así en una espada de doble filo, que por una parte lleva a astillar inconexamente estructuras básicas y esenciales. El resultado inevitable es el imparable descenso hacia una creciente fragmentación del conocimiento, a lo que contribuye de forma casi inconsciente el indudable éxito del progreso biotecnológico.

Uno de los principales blancos y aspiraciones de la ciencia, y por extensión de la medicina experimental, siempre ha sido considerado como el esfuerzo dirigido hacia una unificación racional de la diversidad en orden a reducir las interconexiones al menor número posible de conceptos mutuamente interdependientes<sup>180</sup>. Sólo así se pueden crear estructuras nuevas de un orden de superior categoría como únicas armas creativas contra el desequilibrio, la confusión, la desazón y el caos<sup>181</sup>. La meta final es dar sentido y superar esa espada de doble filo que hace que la "materia" del análisis tecnológico pretenda, primero diluir, y después destruir, la "mente" de perspectivas científicas más integrales, y por ello valiosas. Por ello se puede afirmar finalmente que sólo así el verdadero progreso, más allá de toda redundancia sin sentido por el camino trillado, puede tener lugar.

### Nota adicional

Después de la aceptación de este trabajo, DiGiammarino y cols. han determinado que la base molecular final para la pérdida de la función supresora del gen p53 es un aumento del pH, mediado por una mutación Arg337 a His337 en carcinoma adrenocortical<sup>182</sup>.

### Agradecimientos y dedicatoria

Los autores desean expresar su agradecimiento a los Dres. Jose Luis Arranz y Rafael García Cañero por comentarios, sugerencias y ayuda bibliográfica. Este trabajo está dedicado a la memoria de Emilio Ruiz Gómez.

---

Correspondencia:  
Dr. S. Harguindey  
C/ Postas 13 - 3º izq.  
E-01004 Vitoria (Alava)

## Bibliografía

1. Harguindey S, Pedraz JL, García Cañero R, Pérez de Diego J, Cragoe, EJ Jr. Hydrogen ion-dependent oncogenesis and parallel new avenues to cancer prevention and treatment using a H<sup>+</sup>-mediated unifying approach: pH-related and pH-unrelated mechanisms. *Critical Rev Oncogenesis* 1995; 6(1): 1-33.
2. Perona R, Serrano R. Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature* 1988; 334: 438-440.
3. Reshkin SJ, Belliz A, Caldeira S, et al. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-dependent intracellular alkalinization is an early event in malignant transformation and plays an essential role in the development of subsequent transformation-associated phenotypes. *FASEB J* 2000; 14: 2185-2197.
4. Moolenaar WH, Tsien RY, van der Saag PT, de Laat S W. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature* 1983; 304: 645-648.
5. Pouyssegur J. The growth factor activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system: a genetic approach. En: Bradshaw A, Prentis S, eds. *Oncogenes and growth factors*. Amsterdam-New York-Oxford: Elsevier Science Publications, 1987; 292-297.
6. Grinstein S, Rotin D, Mason MJ. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role of cellular proliferation. *Biochem Biophys Acta* 1989; 988: 73-97.
7. Strazzabosco M, Poci C, Spirli C, et al. Intracellular pH regulation in Hep G2 cells: effects of epidermal growth factor, transforming growth factor- $\alpha$ , and insulin growth factor-II on Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity. *Hepatology* 1995; 22: 588-597.
8. Roepe PD, Wei LY, Cruz J, Carlson D. Lower electrical membrane and altered pH<sub>i</sub> homeostasis in multidrug-resistant (MDR) cells: further characterization of a series of MDR cell lines expressing different levels of P-glycoprotein. *Biochemistry* 1993; 32: 11042-11056.
9. Moolenaar WH, Boonstra J, van der Saag PT, de Laat SW. Sodium/Proton exchange in mouse neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1981; 256: 12883-12887.
10. Lubin M, Chan F, Coutermarsh BA. Amiloride, protein synthesis, and activation of quiescent cells. *J Cell Physiol* 1982; 113: 247-251.
11. Rich IR, Worthington-White OA, Musk P. Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Blood* 2000; 95: 1427-1434.
12. Engström W, Zettenberg A. Membrane protein detachment and mitogenic stimulation induced by alkaline pH. *Cell Biol Intern Rep* 1981; 5: 517-522.
13. Simon S, Roy D, Schindler M. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1128-1132.
14. Keizer HG, Joenje H. Increased cytosolic pH in multidrug-resistant human lung tumor cells: effect of verapamil. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 706-709.
15. Chen Q, Benson RSP, Whetton AD, et al. Role of acid/base homeostasis in the suppression of apoptosis in haemopoietic cells by v-abl protein tyrosine kinase. *J Cell Sci* 1997; 110: 379-387.
16. Daley PF, Cohen JS. Magnetic resonance spectroscopy of tumors and potential in vivo clinical applications: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 770-779.
17. Epand RF, Epand RM, Gupta RS, Cragoe EJ Jr. Reversal of intrinsic multidrug resistance in chinese hamster ovary cells by amiloride analogs. *Br J Cancer* 1991; 63: 247-251.
18. Roepe PD. The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1241: 385-406.
19. Radvakova I, Mirossay J, Mozis J, Mirossay L. The effects of 5'- (N,N-Dimethyl)-amiloride on cytotoxic activity of doxorubicin and vincristine in CEM cell lines. *Physiol Res* 2001; 50: 283-287.
20. Doppler W, Jaggi R, Groner B. Induction of v-mos and activated Ha-ras oncogene expression in quiescent NIH 3T3 cells causes intracellular alkalinization and cell cycle progression. *Gene* 1987; 54: 147-153.
21. Hagag NJ, Lacal JC, Graber M, et al. Microinjection of ras p21 induces a rapid rise in intracellular pH. *Mol. Cell Biol* 1987; 7: 1984-1987.
22. Grunicke H, Maly K, Overhuber H, et al. Role of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in growth stimulation by Ha-ras. En: Crane FL, Löw H, editores. *Plasma oxidoreductases in the control of animal and plant growth*. New York-London: Plenum Press 1988; 369-371.
23. Stotzer OJ, Nussler V, Darsow M, et al. The role of bcl-2 and bax expression ratio for predicting response to chemotherapy in acute myeloblastic leukemia. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* 1996; 37: A2169.
24. Reynolds JE, Li JF, Craig RW, Eastman A. BCL-2 and MCL-1 expression in chinese hamster ovary cells inhibits intracellular acidification and apoptosis induced by staurosporine. *Exp Cell Res* 1996; 225: 430-436.
25. Packham J. Mutation of BCL-2 family proteins in cancer. *Apoptosis* 1998; 3: 75-82.
26. Lagarde AE, Pouyssegur JM. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in cancer. *Cancer Biochem Biophys* 1986; 9: 1-14.
27. Rotin D, Steele-Norwood D, Grinstein S, Tannock I. Requirement of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger for tumor growth. *Cancer Res* 1989; 49: 205-211.
28. Zettenberg A, Engstrom W. Mitogenic effect of alkali-

- nity on quiescent, serum starved cells. *Proc Natl Cancer Inst* 1981; 78: 4334-4438.
29. García Cañero R.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport. En: Crane FL, Morré DJ, Löw H, editores. *Oxidoreduction at the plasma membrane: relation to growth and transport*. Boca Raton: CRC Press, 1990; 237-246.
  30. Harguindey S, Antón Aparicio LM, Martín Algarra S. Integrated etiopathogenesis of cancer of mucosal surfaces with emphasis on the digestive tract. *J Biol. Resp Mod* 1989; 8: 1-10.
  31. Perona R, Murgía JR, Portillo F, Gillies RJ, Serrano, R. Papel del  $\text{pH}_i$  en la proliferación y transformación de células animales. En: *Bases moleculares del cáncer, aplicaciones clínicas y desarrollo tecnológico*. Farmin-dustria, Madrid, 1991; 249-263.
  32. Gonzalez Falcó IG, Madamba AMR, De la Fuente F, Antón Aparicio LM, Chacón M, Harguindey S. Integrated pathophysiological approach to early cervical neoplasia. *J Biol Resp Mod* 1987; 6: 473- 483.
  33. Lawson HH. Effects of duodenal contents on the gastric mucosa under experimental conditions. *Lancet* 1964; 1: 469-472.
  34. Gledhill T, Leicester RJ, Addis B et al. Epidemic hypochlo-rydria. *Br J Cancer* 1985; 290: 1383-1386.
  35. Malothra S. A study of carcinoma of uterine cervix with special reference to its causation and prevention. *Br J Cancer* 1971; 25: 62-71.
  36. Malothra SL. New approaches to the causation and prevention of cancer of epithelial surfaces. *Med Hypo-theses* 1976; 2: 279-281.
  37. Thornton JR. High colonic pH promotes colorectal cancer. *Lancet* 1981; 2: 1081-1082.
  38. Cameron IL. Intervention of sodium flux as a target for cancer chemotherapy. En: *New approaches to cancer chemotherapy*. Academic Press, New York, 1984; 355-374. .
  39. Cragoe EJ Jr, Kleyman ThR, Simchowit L, eds. Amiloride and its analogs: unique cation transport inhibitors. New York: VCH Publishers Inc, 1992.
  40. Harguindey S. Use of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter inhibitors as a novel approach to cancer treatment. En: EJ Cragoe EJ Jr, Kleyman ThR, Simchowit L, eds. *Amiloride and its analogs: unique cation transport inhibitors*. New York: VCH Publishers Inc, 1992; 317-334.
  41. Putney LK, Denker SP, Barber DL. The changing face of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger, NHE1: structure, regulation and cellular actions. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42; 527-552.
  42. Shemtov MM, Cheng DL-W, Kong L et al. LAK cell mediated apoptosis of human bladder cancer cells involves a pH-dependent endonuclease system in the cancer cell: possible mechanism of BCG therapy. *J Urology* 1995;154: 269-274.
  43. Rebollo A, Gómez J, de Aragón AM, Lastres P, Silva A, Pérez-Sala D. Apoptosis induced by IL-2 withdrawal is associated with an intracellular acidification. *Exp Cell Res* 1995; 218: 581-585.
  44. Pérez-Sala D, Collado-Escobar D, Mollinedo F. Intracellular alkalinization supresses lovastatin-induced apoptosis in HL60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J Biol Chem* 1995; 270: 6235-6242.
  45. Li J, Eastman A. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. Role of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiport. *J Biol Chem* 1995; 270: 3203-3211.
  46. Oberhaensli RD, Bore PG, Rampling RP, Hilton-Jones D, Hands L. J, Radda G. K. Biochemical investigation of human tumors in vivo with phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy. *Lancet* 1986; 2: 8-11.
  47. Ober SS, Pardee AB. Intracellular pH is increased after transformation of chinese hamster embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2766-2770.
  48. Shibanuma M, Kuroki T, Nose K. Superoxide as a signal in intracelular pH. *J Cell Physiol* 1988; 136:379-385.
  49. Gillies RJ, Martinez-Zaguilan R, Martinez GM, Serrano R, Perona R. Tumorigenic 3T3 cells maintain an alkaline intracellular pH under physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7414-7418.
  50. Song ChS, Park H, Ross BD. Intra- and extracellular pH in solid tumors. En: Teicher BA ed. *Antiangiogenic agents in cancer therapy*. Totowa, New Jersey. Humana Press Inc, 2000; 51-65
  51. Geck P, Bereiter-Hahn J. The role of electrolytes in early stages of cell proliferation. *Cell Biol Rev* 1991; 25(2): 85-93.
  52. Pouysségur JA, Franchi A, Paris S, Boyer JL. Mechanisms of activation and molecular genetics of the mammalian  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter. En: Häussinger, D, ed. *pH homeostasis: mechanisms and control*. New York: Academic Press, 1988; 61-77.
  53. García Cañero R, Trilla C, Pérez de Diego J, Díaz-Gil, Cobo JM.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange inhibition induces intracellular acidosis and differentially impairs cell growth and viability of human and rat hepatocarcinoma cells. *Toxicol Lett* 1999; 106: 215-228.
  54. Cone CD Jr. Unified theory on the basic mechanism of normal control and oncogenesis. *J Theor. Biol* 1971; 30: 151-181.
  55. Cameron IL, Hunter KE. Effect of cancer cachexia and amiloride treatment on the intracellular sodium content in tissue cells. *Cancer Res* 1983; 43: 1074-1078.
  56. Sparks RL, Pool TB, Smith NKR, Cameron IL. The role of ions, ion Fluxes, and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in the control of proliferation, differentiation, and transformation. En: *Genetic expression of the cell cycle*. New York: Academic Press, 1982; 15: 363-391.

57. Yamamoto Ch, Takemoto H, Kuno K, et al. Cycloprodigiosin hydrochloride, a H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter, induces apoptosis of human colon cancer cells lines *in vitro*. *Oncol Rep* 2001; 8: 821-824.
58. Sparks RL, Pool TB, Smith NKR, Cameron IL. Effects of amiloride on tumor growth and intracellular element content of tumor cells *in vivo*. *Cancer Res* 1983; 43: 73-77.
59. Rotin D, Wan P, Grinstein S, Tannock I. Cytotoxicity of compounds that interfere with the regulation of intracellular pH: a potential new class of anticancer drugs. *Cancer Res* 1987; 47: 1497-1504.
60. Vairo G, Cockss BG, Cragoe Jr. EJ, Hamilton JA. Selective suppression of growth factor-induced cell cycle gene expression by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport inhibitors. *J Biol Chem* 1992; 27: 19043-19046.
61. Doppler W, Maly K, Hofmann J, Grunicke H. Inhibition of tumor cell growth by interference with growth factor induced cell proliferation. En: Galeotti T, Cittadini A, Neri G, Papa S, Smets LA, eds. *Cell membranes and cancer*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985; 344-346.
62. Boscoboinik D, Gupta RS, Epand RM. Altered intracellular pH and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity in multidrug resistance cell lines. *Cancer Chem Pharmacol* 1989; 24: s86.
63. Sánchez-Perez I, Gómez García L, Perona R. Role of intracellular pH on jun kinase activation induced by UV light. VI Congreso de la ASEICA, Barcelona 1995; 98 (Abstr. 251T).
64. Weinhouse S, Warburg O, Burk D, Schade AL. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124: 1267-1272.
65. Stubbs M, Tumor pH. En: Molls M, Vaupel P, eds. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors: implications in clinical radiooncology*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1998: 113-120.
66. Gevers W, Dowle E. The effect of pH on glycolysis *in vitro*. *Clin Sci* 1963; 25: 343-349.
67. Harguindey S. Estrategia unitiva de las células cancerosas. *Metabolismo hidrocarbonado (primera de tres partes)*. *An Int Med* 1994; 5: 247-254.
68. Weinsburg JH, Curcio M, Caron PC, et al. The multidrug-resistant phenotype confers immunological resistance. *J Exp Med* 1996; 183(6): 2699-2704.
69. Tannock IF, Newell K, Rotin D. Therapeutic potential of compounds that inhibit membrane-bound regulation of intracellular pH. *Cancer Chem Pharmacol* 1989; 46:suppl. 2, s85.
70. Mayer LD, Bally MB, Cullis PR. Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *Biochem Biophys Acta* 1986; 857: 123-126.
71. Cobo JM, García Cañero, Valdez JG, Barraso AM, Sailer BL, Crissman HA. Attenuation of apoptotic DNA fragmentation by amiloride. *J Cell Physiol* 1998; 175 (1): 59-67.
72. Mitchell P. Chemosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev* 1966; 41: 445-502.
73. Ives HE, Rector FC. Proton transport and cell function. *J Clin Invest* 1984; 73: 285-290.
74. Thiebaut F, Currier SJ, Whitaker J, et al. Activity of the multidrug transporter results in alkalinization of the cytosol: measurement of cytosolic pH by microinjection of a pH-sensitive dye. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 685-690.
75. Goda K, Balkay L, Marian T, Tron L, Aszalos A, Szabo G. Intracellular pH; does not affect drug extrusion by P-glycoprotein. *J Photochem Photobiol B* 1996; 34: 177-182.
76. D'Incalci M, Broxterman HJ, van Kalken CK. Membrane transport in multidrug resistance, development and disease. *Ann Oncol* 1991; 2: 635-639.
77. Marquard D, Center MS. Involvement of vacuolar H<sup>+</sup>-adenosine triphosphatase activity in multidrug resistance in HL60 cells. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1098-1102.
78. Dröse S, Bindseil KU, Bowman EJ et al. Inhibition effect of modified bafilomycins and concamycins on p- and v- type adenosintriphosphatases. *Biochem* 1993; 32: 3902-3906.
79. Ohta T, Arakawa H, Futagami F, et al. Bafilomycin A1 induces apoptosis in the human pancreatic cancer cell line Capan-1. *J Pathol* 1998; 185: 324-330.
80. Huot SJ, Aronson PS. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger and its role in essential hypertension and diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1991; 14(6): 521-525.
81. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285: 1182-1186.
82. Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol* 2001; 28: 536-542.
83. Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of tumor metastasis. *Cell* 1994; 79: 185-188.
84. El-Awad B, Kreft B, Wolber EM et al. Hypoxia and interleukin-1 beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Intern* 2000; 58 (1): 43-50.
85. Akagi Y, Liu W, Xie K, Zebrowski B, Shaheen RM, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin-1 beta. *Br J Cancer* 1999; 80 (10): 1506-1511.
86. Maruyama K, Mori Y, Murasawa S et al. Interleukin-1 beta upregulates cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR/flk-1 via activation of protein tyrosine Kinases. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(3): 607-617.

87. Civitelli R, Teitelbaum SL, Hruska KA, Lacey DL. IL-1 activates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in a murine T cell. *J Immunol* 1989; 143 (12): 4000-4008.
88. Sardet C, Fafournoux P, Pouyssegur J. Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem* 1991; 266 (29):19166-19177.
89. Di Sario A, Baroni GS, Bendia E, et al. Intracellular pH regulation and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in human hepatic stellate cells: effect of platelet-derived growth factor, insulin-like growth factor 1 and insulin. *J Hepatology* 2001; 34 (3):378-385.
90. Benos DJ, McPherson S, Hahn BH, Chaikin MA, Benvenise En: Cytokines and HIV envelope glycoprotein gp 120 stimulate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in astrocytes. *J Biol Chem* 1994; 269 (19):13811-13816.
91. Avery RL, Connor TB Jr, Farazdaghi M. Systemic amiloride inhibits experimentally induced neovascularization. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 1474-1476.
92. Kellen JA, Mirakian A, Kolin A. Antimetastatic effect of amiloride in an animal tumor model. *Anticancer Res* 1987; 8: 1373-1376.
93. Fields BN, Eagle H. The pH-dependence of reovirus synthesis. *Virology* 1973; 52: 581- 583.
94. Riley V. Synergistic glycolytic activity associated with transmissible agents and neoplastic growth. En: Wright B, ed. *Control mechanisms in respiration and fermentation*. New York: The Ronald Press, 1961; 211-241.
95. Levy HB. Metabolic effects of animal viruses. En: Wright B, ed. *Control mechanisms in respiration and fermentation*. New York: The Ronald Press, 1961; 189-210.
96. Rubin H, Fodge D. Interrelationships of glycolysis, sugar transport and the initiation of DNA synthesis in chick embryo cells. En: B. Clarkson B, Baserga R, eds. *Control of Proliferation of Animal Cells*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974; 801-816.
97. Harguindey S. Estrategia unitiva de las células cancerosas. Ion de hidrógeno como factor unitario multidimensional y metabolismo hidrocarbonado (segunda de tres partes). *An Int Med* 1994; 2: 299-303.
98. Harguindey S. Estrategia unitiva de las células cancerosas. Metabolismo graso y proteínico. Conclusiones (tercera de tres partes) *An Int Med* 1994; 2: 351-358.
99. Harguindey S, Galdós I, Takita H. Cáncer de pulmón como tumor de cicatriz: a propósito de un caso y posibles mecanismos etiopatogénicos. *An Int Med* 1994; 2: 285-287.
100. Harguindey S, Pedraz J. L, García Cañero R, Katin M. Edelfosine, apoptosis, MDR and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger: induction mechanisms and treatment implications. *Apoptosis* 2000; 5: 87-89.
101. Harguindey S, Gillis ML. Evolution and cancer: possible relationships to changes in environmental hydrogen ion concentration. *J Theor Biol* 1980; 86: 487-492.
102. Del Peso L. Apoptosis y cáncer. *Rev Oncol* 2000; 2: 180-190.
103. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
104. Barry MA, Reynolds JE, Eastman A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. *Cancer Res* 1993, 53: 2349-2357.
105. Wolf ChM, Reynold JE, Morana SJ, Eastman A. The temporal relationship between protein phosphatase. ICE/CED-3 proteases, intracellular acidification, and DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; 230; 22-27.
106. Mollinedo F, Fernández Luna JL, Gajate C, et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by bcl-2 and bcl x<sub>L</sub>. *Cancer Res* 1997; 57: 1320-1328.
107. Overbeeke R, Yildirim M, Reutenlingsperger CPM, Haaen C, Vermes I. Sequential occurrence of mitochondrial and plasma membrane alterations, fluctuations in cellular Ca<sup>2+</sup> and pH during initial and later phases of cell death. *Apoptosis* 1999; 4: 455-460.
108. Angoli D, Delia D, Wanke E. Early cytoplasmic acidification in retinamide-mediated apoptosis of human promyelocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 681-685.
109. Furlong IJ, Ascaso R, Rivas AL, Collins MKL. Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity. *J Cell Sci* 1997; 110: 653-661.
110. Park HJ, Lyons JC, Ohtsubo T, Song CW. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *Br J Cancer* 1999; 80(2): 1892-1897.
111. Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biol* 2000; 2: 318-325.
112. Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E, Babior BM. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Nat Acad Sci* 1996; 93: 654-658.
113. Zangemeister-Wittke U, Ziegler A. Bcl-2 antisense therapy for cancer: the art of persuading tumour cells to commit suicide. *Apoptosis* 1998; 3: 67-74.
114. Nuydens R, Dispersyn G, Van Den Kieboom et al. Bcl-2 protects neuronal cells against taxol-induced apoptosis by inducing multi-nucleation. *Apoptosis* 2000; 5: 335-343.
115. Besson O, Goré J, Vincent E, Hoinard C, Bougnoux P. Inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity by an alkyllysophospholipid analogue in a human cancer cell line. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1153-1158.

116. Gottlieb RA, Giesing HA, Zhu JY, Engler RL, Babior BM. Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5965-5968.
117. Lang F, Ritter M, Gamper N, et al. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. *Cell Physiol Biochem* 2000; 10: 417-428.
118. Cartee L, Kucera GL, Willingham MC. Induction of apoptosis by gemcitabine in BCG-1 human ovarian cancer cells compared with staurosporine, paclitaxel and cisplatin. *Apoptosis* 1998; 3: 439-449.
119. Murakami T, Shibuya I, Ise T, et al. Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular pH in cisplatin resistance. *Int J Cancer* 2001; 93: 869-874.
120. Shrode LD, Tapper H, Grinstein S. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis. *J Bioenergetics Biomembranes* 1997; 29 (4): 393-399.
121. Belaud-Rotureau MA, Leducq N, Macouillard Pouletier de Gannes F, et al. Early transition ride in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis. *Apoptosis* 2000; 5 (6): 551-560.
122. Meng XW, Fraser MJ, Feller JM, Ziegler JB. Caspase-3-dependent and caspase -3-independent pathways leading to chromatin DNA fragmentation in HL-60 cells. *Apoptosis* 2000; 5: 61-67.
123. Li J, Eastman A. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. Role of the Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup>-antiport. *J Biol Chem* 1995; 270(2): 3203-3211.
124. García Cañero, Trilla C, Cobo JM, Díaz Gil JJ. Apoptotic cell death promoted by NHE1 inhibition in rat and human hepatocarcinoma cells. *European Tissue Society Congress*. Sept 30-October 2, 2001 Granada. Spain (abstracto).
125. Newell KJ, Tannock IF. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors; effect of carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone. *Cancer Res* 1989; 49: 4477-4482.
126. Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortés ML, Gómez del Pulgar T, Izquierdo M, Guzmán M. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature Med* 2000; 6(3), 313-319.
127. Blázquez C, Sánchez C, Daza A, Galve-Roperh, Guzmán M. The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem* 1999; 72(4):1759-1768.
128. Magee B, Rofe AM, Potenzy N, Conyers RA. Reduction of malignant cell growth by ketone bodies: *Postgrad Med Educ Ass Inc.*, 1978;175.
129. Harguindey S. El pH en la etiopatogénesis y tratamiento del cáncer. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco, Bilbao, 1990.
130. Pavelic K, Slijepcevic F, Pavelic M et al. Growth and treatment of Ehrlich tumor in mice with alloxan-induced diabetes. *Cancer Res* 1979; 39: 1807-1813.
131. Conyers A. J, Need AG, Durbridge T, Harvey NDM, Potenzy N, Rofe AM. Cancer, ketosis and parenteral nutrition. *Med J Austral* 1979; 1: 398-399.
132. Maly K, Oerhuber H, Doppler W, et al. Effect of Ha-ras on phosphatidylinositol metabolism, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter and mobilization of intracellular calcium. *Adv Enzyme Regul* 1988; 27: 121-127.
133. Harguindey S, Cragoe EJ Jr, García Cañero R. pH effects on tumors growth and an H<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport system-related approach to the treatment of at least ras p21 and v-mos dependent tumors. *Cancer Chem Pharmacol* 1989; 24:(suppl 2), s86.
134. Harguindey S, Cragoe EJ Jr. The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in oncology in the light of the spontaneous regression of cancer and cell metabolism. *Med Hypotheses* 1992; 39: 229-237.
135. Luo J, Tannock IF. Inhibition of the regulation of intracellular pH: potential of 5-(N,N-hexamethylene) amiloride in tumor-selective therapy. *Br J Cancer* 1994; 70: 617-624.
136. Maidorn RP, Cragoe EJ Jr, Tannock IF. Therapeutic potential of analogues of amiloride: inhibition of intracellular pH as a possible mechanism of tumor selective therapy. *Br J Cancer* 1993; 67: 297-303.
137. Hamilton G, Cosetini EP, Teleky B, et al. The multidrug-resistance modifiers verapamil, cyclosporine A and tamoxifen induce an intracellular acidification in colon carcinoma cells in vitro. *Anticancer Res* 1993; 13(6A): 2059-2063.
138. Gerweck L, Seetharaman K. Cellular gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 1994-1998.
139. Haveman J. The influence of pH on the survival after X-irradiation of cultured malignant cells. Effects of carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone. *Int J Rad Biol* 1980; 37: 201-205.
140. Muindi J, Young C, Grandi M, et al. Studies on the role of an expanded intracellular vesicular system and protonation in pleiotropic drug resistance. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1987; 28: 1103.
141. Kaplan DL, Borona WF. Long-term expression of c-H-ras stimulates Na-H and Na (+)-dependent Cl- HCO<sub>3</sub> exchange in NIH-3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 269, 4116-4124.
142. Orive G, Pedraz JL, Harguindey S. Angiogenesis and hydrogen ion (H<sup>+</sup>) dynamics: from pathogenesis to treatment. (enviado para publicación, 2002).
143. Moore KS., Wehrli S, Heinrich R et al. Squalamine: an

- aminosterol antibiotic from the shark. *Proc Natl Acad Sci* 90:1354-1358, 1993.
144. Swallow CJ, Grinstein S, Rotsein O. A vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase regulates cytoplasmatic pH in murine macrophages. *J Biol Chem* 1990; 265:7645-7654.
  145. Vogler WR, Liu J, Volpert O, Ades EW, Bouck N. The anticancer drug edelfosine is a potent inhibitor of neovascularization in vivo. *Cancer Invest* 1998; 16(8): 549- 553.
  146. Candal FJ, Bosse DC, Vogler WR, Ades EW. Inhibition of induced angiogenesis in a human microvascular endothelial cell line by ET-18-OCH<sub>3</sub>. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994; 34: 175- 178.
  147. Vogt B, Frey FJ. Inhibition of angiogenesis in Kaposi's sarcoma by captopril. *Lancet* 1997; 349: 1148.
  148. Sipos EP, Brem H. Local anti-angiogenic brain tumor therapies. *Journal of Neuro-Oncol* 2000; 50 (1-2):181-188.
  149. Bhargava P, Marshall JL, Dahut W, et al. A phase I and pharmacokinetic study of squalamine, a novel antiangiogenic agent, in patients with advanced cancers. *Clinical Cancer Res* 2001; 7(12): 3912-3919.
  150. Fotsis T, Pepper MS, Aktas E et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res* 1997; 57(14): 2916-2921.
  151. Alliegro MA, Kimberly DD, Cragoe EJ Jr, Glaser BM, and Alliegro MC. High-performance liquid chromatographic method for quantitating plasma levels of amiloride and its analogs. *J Chromatography* 1992; 582:217-223.
  152. Vasalli JD, Belin D. Amiloride selectively inhibits the urokinase-type plasminogen activator. *FEBS Lett* 1987; 214(1):187-191.
  153. Harguindey S, Orive G, Pedraz JL, Bello G, Arranz JL. Curación aparente de un caso de carcinoma de ovario metastático después de tratamiento crónico con inhibidores del antiportador Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>. *Oncología*, 2002 (en prensa).
  154. Mayer W. Cancer- its origin, its development and its self-perpetuation- the therapy of operable and inoperable cancer in the light of a systemic conception of malignancy. New York: Paul B Hoeber Inc., 1931.
  155. Reding E. L'équilibre acide-base et l'équilibre ionique dans le cancer et le precancer. *Cancer (Brux)* 1928; 2: 97-152
  156. Reding E, Slosse A. Des caracteres generaux de l'etat cancéreux et precancéreux. *Bull Ass Francaise Cancer* 1929; 18: 122-151.
  157. Anghlieri LJ. Tumor growth inhibition by ammonium chloride induced acidosis. *Int J Pharmacol Biopharm* 1975; 12: 320- 326.
  158. Harguindey S. Hydrogen ion dynamics and cancer: an appraisal. *Med Pediatr Oncol* 1982; 10: 217-236.
  159. Goldfeder A. Theroetical basis for the acidotic treatment of neoplasia. *Am J Surg* 1933; 19: 307- 312.
  160. Harguindey S, Henderson ES, Naeher C. Effect of systemic acidification of mice with sarcoma 180. *Cancer Res* 1979; 39: 4364-4371.
  161. Verne J, Roth PC. The role of different factors which can present experimental cancer. *Arch Anat Pathol* 1963; 11: 137-140.
  162. Mori K. Inhibition of experimental production of liver cancer by addition of acetic acid to the diet. *Gann* 1953; 44: 429-434.
  163. Selawry OS, Swchartz MR. Growth inhibition of sarcoma 180 by lactic acid. *Proc Am Soc Cancer Res* 1963; 4: 61
  164. Harguindey S, Kolbeck RC, Bransome ED Jr. Uretero-sigmoidostomy and cancer: new observations. *Ann Int Med* 1975; 83: 833.
  165. Everson TC, Cole WH. Spontaneous regression of cancer. WB Saunders, Philadelphia-London, 1966.
  166. Harguindey S. Regresión espontánea del cáncer: visión integral y posibles mecanismos mediadores. *Neoplasia* 1985; 2(2): 87-90.
  167. Mahoney EM. Complete regression of vesical carcinoma following urinary diversion. *Am J Surg* 1960; 100: 133-136.
  168. Harguindey S, Gillis MJ. Experimental and human cancer, pH, and spontaneous regressions. *American Lab* 1979; 1: 91-92.
  169. Preisler HD. Resistance to cytotoxic therapy: a speculative overview. *Ann Oncol* 1995; 6: 651-657.
  170. Cragoe EJ. Jr. Other potential medical uses and summary. En: Cragoe EJ Jr, Kleyman ThR, Simchowicz L, eds. Amiloride and its analogs: unique cation transport inhibitors. New York; VCH Publishers Inc, 1992; 335-350.
  171. Harguindey S. Integrating fields of cancer research through pivotal mechanisms and synthetic final pathways: A unifying and creative overview. *Med Hypotheses* 2002 (en prensa).
  172. Harguindey S, Catalán J, Antón-Aparicio LM. Possible exploitation of an H<sup>+</sup>-related mechanism in the treatment of breast and colon tumors: a new approach to the adjuvant treatment of cancer. En Crane FL, Morré DJ, Löw H, eds. Plasma oxidoreductases in control of animal and plant growth. New York-London: Plenum Press, 1988; 415-418..
  173. Podo FG, Carpinelli M, Di-Vito M et al. Nuclear magnetic resonance analysis of tumor necrosis factor-induced alterations of phospholipid metabolites and pH in Friend leukemia cell tumors and fibrosarcomas in mice. *Cancer Res* 1987; 47: 6481-6489.
  174. Jensen E, Buresh C, Norton JA. Lactic acidosis increases tumor necrosis factor secretion and transcription in vitro. *J Surg* 1990; 49: 350-353.

175. Appelberg R, Orme IM. Effector mechanisms involved in cytokin-mediated bacteriostasis of mycobacterium avium infections in murine macrophages. *Immunol* 1993; 80: 352-359.
  176. Harguindey S, Katin M, Edgerton F, Takita H. Hierarchical organization, integrations in biology and cancer, balance loss, and a question on modernism. *Med Hypotheses* 1981; 7: 1123-1132.
  178. Harguindey S. A quintaessential approach to crisis and disease: the CCPC theory. *Int J Transp Studies* 2000; 19: 41-62.
  179. Altan N, Chen Y, Schindler M, Simon SM. Defective acidification in human breast tumor cells and implications in chemotherapy. *J Exp Med* 1998; 187(10): 1583-1598.
  180. Einstein A. *Ideas and opinions*. New York: Del Publishing Co., 1954, 57.
  181. Rof Carballo J. *Medicina y actividad creadora*. Madrid: Revista de Occidente, 1964; 13-15.
  182. DiGiammarino L, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nature Struct Biol* 2002; 9: 12-16.
-