

Efectos del D-002 sobre la esofagitis duodenal crónica (16 semanas) en ratas

Effects of D-002 on chronic duodenal esophagitis (16 weeks) in rats

Zullyt Zamora-Rodríguez^a, Licet Mena-Valdés^a, Vivian Molina-Cuevas^a, Mirian Noa-Puig^a, Maikel Valle-Clara^a, José Alberto Medina-Pirez^a

^aUnidad de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba.

*zullyt.zamora@cnic.edu.cu

Recibido: 8-01-2018; **Aceptado:** 22-08-2018

RESUMEN

La incidencia de adenocarcinomas esofageales es una de las complicaciones de la esofagitis por reflujo duodenal. El D-002 posee efecto esófago-protector demostrado en diferentes modelos experimentales de esofagitis agudo y crónico. Con el objetivo de evaluar la influencia del D-002 en la formación de adenocarcinomas esofageales inducidos por el reflujo duodeno esofágico (RDE) experimental en ratas, se emplearon ratas SD macho. Los animales se dividieron en cinco grupos experimentales, un control sin RDE, y otros cuatro a las que se les induce el RDE mediante proceder quirúrgico y reciben tratamiento con D-002, indometacina y omeprazol, a las dosis de 2, 20 y 200 mg/kg, respectivamente, durante un periodo de 16 semanas. Al finalizar los tratamientos, los esófagos se evaluaron macroscópicamente y se determinó el índice de lesiones esofágicas (ILE). Posteriormente, el tejido esofágico fue conservado en formaldehído para análisis histológico. Los resultados mostraron que los tratamientos de D-002, indometacina y omeprazol redujeron significativamente (40, 35 y 50 %, respectivamente) el ILE, sin evidencias de cambios histológicos significativos con respecto al control positivo (RDE). Concluyendo que la administración oral del D-002 puede ser utilizado como tratamiento de largo plazo en la esofagitis por reflujo duodenal, a pesar de no revertir los cambios histopatológicos esofágicos inducidos por el reflujo duodenal.

Palabras clave: Reflujo duodeno esofágico; D-002; Indometacina; Omeprazol; adenocarcinoma

ABSTRACT

The increased incidence of esophageal adenocarcinomas is a complication of duodenal reflux oesophagitis. D-002 has an oesophageal-protective effect demonstrated in different experimental models of acute and chronic esophagitis. In order to evaluate the influence of D-002 in esophageal adenocarcinomas formation induced by experimental duodenal esophageal reflux (DER) in rats, male SD rats were used. The animals were divided into five experimental groups, one control without DER, and four with DER induction by surgical procedure and receiving treatment with D-002, indomethacin and omeprazol at doses of 2, 20 y 200 mg/Kg, respectively, over a period of 16 weeks. At the end of treatments, the esophagus macroscopically was evaluated and the ILE was determined. Subsequently, the esophageal tissue was preserved in formaldehyde for histological analysis. The

results showed that D-002, indomethacin and omeprazole treatments, significantly reduced (40, 35 and 50 %, respectively) ILE; therefore, there were no significant histologic changes compared to positive control (DER). We concluded that oral administration of D-002 may be used as long-term treatment of duodenal reflux esophagitis, although not reverse the esophageal histological changes induced by duodenal reflux.

Keywords: Duodeno esophagealreflux; D-002; Indometacine; Omeprazole; adenocarcinome

INTRODUCCIÓN

La incidencia del adenocarcinoma esofágico (ADC) ha incrementado dramáticamente tanto en Estados Unidos como en Europa del este en las últimas décadas (Shaheen *et al*, 2000; Pera *et al*, 2005; Rubenstein *et al*, 2013). Las razones de este sustancial incremento aún son desconocidas, pero se han asociado al incremento en la incidencia de la enfermedad de reflujo gastro-esofágico (ERGE) y el esófago de Barrett (EB), reconocido como factor de riesgo fundamental en el desarrollo del ADC, a pesar de que los cambios moleculares implicados en la progresión de la ERGE a EB y al ADC aún no han sido completamente dilucidados (Chang *et al*, 2005). No obstante, lo que sí es conocido es que la evolución crónica de la ERGE representa el punto de inicio de la siguiente secuencia: ERGE, inflamación, EB, bajo grado de displasia, alto grado de displasia, carcinoma *in situ* y adenocarcinoma invasivo (Sikkema *et al*, 2010).

En este sentido, ha sido demostrado que la supresión de ácido en el tejido esofágico producto de la exposición del mismo al contenido duodenal que presenta características alcalinas constituye un factor fundamental en la génesis del EB y ADC (Orel y Vidmar, 2007; Kauer y Stein, 2010; Peng *et al*, 2011). Aunque la transformación del tejido esofágico a EB forma parte de la progresión a la formación de ADC, este es considerado como un proceso adaptativo que ocurre como consecuencia de la resistencia a la apoptosis celular (Peters y Avosar, 2010), dependiendo de la severidad del daño (Miyashita *et al*, 2013).

Por otra parte, estudios moleculares sobre el proceso fisiopatológico de la esofagitis inducida por reflujo biliar han demostrado que los ácidos biliares (AB) activan la transcripción génica para la expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la prostaglandina-E₂ (PGE₂) (Pizuelo *et al*, 2012), las cuales juegan un rol importante en los procesos inflamatorios (Hashimoto, 2012). Este hallazgo sustenta el hecho de que la administración de nimesulide (Oyama *et al*, 2007) y celecoxib (Zhang *et al*, 2012) (inhibidores específicos de la COX-2), e incluso la indometacina y la aspirina, a bajas dosis, (inhibidores inespecíficos de COX-1 y 2) (Esquivias *et al*, 2012; Selvan *et al*, 2012) ha resultado efectiva en la prevención de la formación de EB y adenocarcinoma en modelos experimentales de reflujo duodeno esofágico (RDE).

Independientemente de las causas que originan la ERGE, ya sea por reflujo gástrico, biliar o mixto, el tratamiento clásico son los antisecretores orientados al control de la sintomatología clínica, ya sea por reducir tanto la frecuencia como la acidez del contenido refluído. Sin embargo, la supresión del ácido mediante el uso de los inhibidores de la bomba de protones (IBP) (Kahrilas *et al*, 2008; Johnson *et*

al, 2010; Pace *et al*, 2011; Yoshida *et al*, 2011), si bien mejora la sintomatología general de los pacientes con ERGE, no resulta eficaz en aquellos que presentan reflujo biliar (Kahrilas *et al*, 2011). Ejemplo de ello, lo constituyen fármacos como el pantoprazol y rabeprazol, (Duman *et al*, 2011; Duman *et al*, 2013) cuya ineficacia en este tipo de pacientes ha estado asociada a que secundariamente reducen el tono del esfínter inferior esofágico (Jankowski y Anderson, 2004). Además, ha sido reportado que estos IBP no favorecen la regresión de la formación de EB (Leedham y Jankowski, 2007; Sifrim y Zerbib, 2012).

El uso prolongado de los fármacos IBP es otro de los aspectos importantes que sugieren el fracaso de la terapia convencional de la ERGE debido a las reacciones adversas (Sifrim y Zerbib, 2012) que se presentan como la hipomagnesemia e hipomagnesuria (Hoon *et al*, 2010; Thongon *et al*, 2011), el desarrollo de adenocarcinomas a causa del incremento de la gastrina (hipergastrinemia) infecciones entéricas por *clostridiumdifficile* relacionadas con la supresión de ácido (Orlando *et al*, 2007; Garcia- Rodriguez *et al*, 2007), la ocurrencia de fracturas (Yang *et al*, 2006), complicaciones renales y respiratorias (Geevasinga *et al* 2006), así como la disminución de la biodisponibilidad de drogas dependientes del ácido gástrico (Silver-Matula *et al*, 2009). En este contexto, el reforzamiento con el uso de sustancias antioxidantes y citoprotectores gástricos, también han atenuado la esofagitis inducida por reflujo (Song *et al*, 2016). En consonancia con estos antecedentes, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para tratar la ERGE que sean eficaces y seguras constituye una problemática actual.

El D-002 es una mezcla de seis alcoholes alifáticos primarios de alto peso molecular obtenido de la cera de abejas (*Apis mellifera*), cuyo componente principal es el triacontanol, además del dotriacontanol, tetratriacontanol, tetracosanol, hexacosanol y octacosanol (Mas, 2001). El D-002 (25-200 mg/kg) administrado como dosis únicas y repetidas a ratas con esofagitis por RGE agudo y crónico ejerce un marcado efecto esófago-protector asociado a la disminución de las concentraciones de malondialdehído (MDA) y grupos sulfhídricos (SH), marcadores de peroxidación lipídica y oxidación proteica, respectivamente, en tejido esofágico (Zamora *et al*, 2014; Zamora *et al*, 2015a). Por otra parte, el D-002 también mostró un efecto esófago-protector en el modelo de reflujo duodenal crónico, si bien resultó ineficaz en la esofagitis inducida por reflujo gastro-duodeno-esofágico (RGDE) (Zamora *et al*, 2015b). Teniendo en cuenta la eficacia del D-002 para prevenir el desarrollo de la esofagitis inducida por RDE demostrado macroscópicamente (Zamora *et al*, 2015b) y corroborado histológicamente (Noa *et al*, 2016) y el papel que juega el reflujo de tipo biliar en la progresión del daño esofágico a EB y la formación final de ADC, se considera como objetivo evaluar el efecto del D-002 sobre los cambios histológicos que ocurren durante la progresión de la esofagitis inducida por RDE crónico en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos (250-300 g de peso corporal) provenientes del CENPALAB (Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, Mayabeque, Cuba), las cuales fueron adaptadas durante siete días a

las condiciones de laboratorio (temperatura de 20 a 25 °C, humedad relativa de 60 ± 10 %, ciclos de luz/oscuridad de 12 h) con libre acceso al agua y la comida.

Sustancias de estudio

El D-002 (lote: 030040109) fue obtenido en la Planta de Producción de Productos Naturales (CNIC, La Habana, Cuba), el Omeprazol (OMP) (lote: 0912027) y la Indometacina (lote: T15-184) ambos fueron suministrados por Laboratorios Novatec (La Habana, Cuba). El D-002, el OMP y la Indometacina se prepararon en forma de suspensión en goma acacia al 1 %.

Tratamientos y administración

Todos los tratamientos (vehículo, D-002, OMP e Indometacina) se administraron por vía oral (v.o) mediante entubación intragástrica (5 mL/kg) durante 16 semanas, comenzando 72 h después de inducido el RDE. Las ratas se distribuyeron en cinco grupos experimentales: un control negativo sin RDE (vehículo) y cuatro grupos a los cuales se les indujo el RDE: un grupo control positivo (vehículo), un grupo tratado con D-002 (200 mg/kg), y otros dos grupos tratados con Indometacina (2 mg/kg) y Omeprazol (20 mg/kg), como sustancias de referencia. Las dosis de D-002 (Zamora *et al*, 2015a) y OMP (Zamora *et al*, 2015b) se seleccionaron teniendo en cuenta estudios previos de RDE mientras que la dosis de Indometacina se seleccionó según reportes de la literatura de su eficacia sobre la formación de ADC esofágico (Selvan *et al*, 2012) y cáncer colorectal (Brown *et al*, 2009) en roedores.

Inducción del reflujo duodeno esofágico

Los animales fueron sometidos a un período de ayuno de 24 h y se les retiró el agua entre las 6-8 h antes de la cirugía. Se les realizó la parotomía mediante una incisión en la línea media, previa anestesia con tiopental sódico (40 mg/kg), rasurado y desinfección del campo operatorio. De forma preventiva se administró una primera dosis de penicilina por vía intramuscular (150 000 UI/kg) antes de la cirugía y una segunda dosis 24 h después de la cirugía (Selvan *et al*, 2012). Posteriormente, se realizó la anastomosis del esófago con el duodeno, de forma término-terminal, con total gastrectomía para la inducción del RDE (Hashimoto, 2012).

Una vez concluida la cirugía, las ratas fueron mantenidas en ayuno durante 48 h con agua *ad libitum* y se les administró Dipirona (analgésico) 2 mg/kg por vía subcutánea, cada 24 h, durante las siguientes 72 h postquirúrgicas. Al término de las 16 semanas después de inducido el RDE y una vez concluido el tratamiento se les aplicó la eutanasia a los animales mediante sobredosis de anestésico (tiopental 100 mg/kg). Los esófagos fueron localizados y extraídos, se abrieron longitudinalmente y se cuantificó el área lesionada. Posteriormente, fueron conservados en formaldehído al 10 % para su posterior análisis histopatológico.

Mediciones a realizar

Se realizó el examen macroscópico del tejido esofágico bajo una lupa, y con una regla milimetrada se cuantificó el área total lesionada y se expresó en mm² (Estêvão-Costa *et al*, 1994).

El porcentaje de inhibición se calculó como sigue:

$$I (\%) = 100 - \frac{(\text{ILE t} \times 100)}{\text{ILEc}}$$

Donde: ILE t = índice de lesiones del grupo tratado

ILE c = índice de lesiones del grupo control positivo

Análisis histopatológico del tejido esofágico

Los esófagos fueron lavados en solución salina (0,9 %), seguidamente fijados en disolución buffer de formaldehído (10 %) y embebidos en parafina. Posteriormente, se cortaron secciones del tejido que fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Los tejidos fueron observados y analizados a ciegas, en un microscopio *Carl Zeiss Primo Star*, por un especialista en histopatología.

El Índice de Cambios Histológicos (ICH) se cuantificó teniendo en cuenta el puntaje descrito para la clasificación de los cambios histológicos que se producen en la progresión de la esofagitis crónica (Tabla 1). El valor del ICH es el resultado de la media de la sumatoria del puntaje de los cambios observados en la estructura del epitelio esofágico.

Tabla 1. Puntaje de clasificación de cambios histológicos para la evaluación del tejido esofágico

Descripción	Puntaje
Hiperplasia célula basal	1
Metaplasia intestinal	2
Displasia	3
Adenocarcinoma	4
Carcinoma escamoso	5

Análisis estadístico

La comparación entre grupos se realizó con el test paramétrico ensayo de Tukeys de comparaciones múltiples. *A priori* se estableció un nivel de significación $\alpha = 0,05$ para la significación estadística. Los datos se procesaron con el paquete de programa *GraphPadPrism* para Windows (v. 5 Demo).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos evidencian la eficacia del D-002 para reducir la extensión del daño esofágico, inducido por RDE crónico, sin provocar cambios en cuanto al daño histológico (tabla 2).

Tabla 2. Efectos del D-002 sobre el ILE y ICH inducido por el RDE (16 semanas) en ratas.

Grupos	Dosis (mg/kg)	ILE (mm ²)	I (%)	ICH
Control (-)	-	0,00 ± 0,00 ***	--	0,0 ± 0,0 ***
RDE (Control Post).	-	520, 8 ± 21,36	--	6,00 ± 1,03
RDE + D-002	200	323, 30 ± 12,62 ***	40	6,36 ± 0,88
RDE + Indometacina	2	335, 10 ± 13,04 ***	35,6	6,14 ± 1,28

RDE + Omeprazol	20	261,11 ± 22,33 ***	50	5,60 ± 0,92
-----------------	----	--------------------	----	-------------

X± ESM, I (%): porcentaje de inhibición, ILE: Índice de lesiones esofágicas. ICH: índice de cambios histológicos. *** p < 0,01 Comparación vs Control positivo (Ensayo paramétrico de Tukeys para comparaciones múltiples).

El grupo de animales designados como control positivo con RDE de 16 semanas de evolución, muestran un incremento significativo tanto del índice de lesiones esofágicas (ILE) como del ICH, con respecto al grupo control negativo, corroborando de esta forma la reproducibilidad del modelo experimental (Hashimoto, 2012; Selvan *et al*, 2012; Yoshida *et al*, 2011; Zamora *et al*, 2015a; Zamora *et al*, 2015b), bajo nuestras condiciones experimentales. Tal como se ha reportado, el RDE (16 semanas) desarrolla cambios histológicos en el tejido esofágico, tales como hiperplasia de la célula basal, metaplasia intestinal, displasia, adenocarcinoma y carcinoma escamoso, evaluados mediante el ICH (Selvan *et al*, 2012). Nuestros resultados, revelan que el 100 % de los animales del grupo control positivo desarrollaron en el tejido esofágico todos los cambios antes mencionados.

El tratamiento oral con D-002 a la dosis de 200 mg/kg redujo significativamente (40 % de inhibición) el ILE, en comparación con el grupo control positivo. Este resultado está en correspondencia con reportes anteriores, donde se demostró la acción esófago-protectora del D-002, en la esofagitis crónica inducida por el RDE (14 días de evolución) (Zamora *et al*, 2015b; Noa *et al*, 2016). Si bien, en cuanto al daño histológico en la esofagitis por RDE (16 semanas), la administración oral de D-002 lamentablemente no influyó sobre el ICH característicos de dicho modelo, a diferencia del estudio de esofagitis crónica inducida por el RDE (14 días) donde el D-002 revirtió el daño histológico (Noa *et al*, 2016).

Dentro de los procesos tumorigénicos y de metástasis de carcinomas, la COX-2 y la PGE2 juegan un papel fundamental mediante diferentes mecanismos. En este sentido ha sido demostrado que la expresión de COX 2 promueve la proliferación celular, mediante la activación de receptor del factor de crecimiento endotelial (RFCE) (Pai *et al*, 1995), la inhibición de la apoptosis mediante el incremento de la proteína Bcl-2 antiapoptótica (Tsujii y DuBais, 1995), y la supresión de la respuesta del sistema inmune (Sharman *et al*, 2003). Por otra parte, la COX-2 induce la angiogénesis, con la expresión del Factor de crecimiento de endotelio vascular (FCEV) () y facilita la metástasis mediante el incremento de la metaloproteínas -2 (MMP-2) (Li *et al*, 2002; Tsujii *et al*, 1997). Por tanto, teóricamente, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y sustancias de origen natural (con acción sobre estos mediadores) pudieran ser candidatos como agente quimiopreventivo frente a la tumorigénesis, a través de la inhibición de la COX-2. En efecto, existen reportes del incremento de expresión de COX-2 y PGE2 en mucosa esofágica usando el modelo de reflujo Duodeno-gastro-esofágico y reflujo biliar (Zhang *et al*, 2001). Considerando, la influencia de la COX-2 dentro del proceso carcinogénico y que el D-002 ha demostrado inhibir dicha enzima (Pérez *et al*, 2014), nos planteamos como hipótesis de trabajo, que el D-002 pudiera influir sobre la progresión de la esofagitis hacia la formación de ADC, inducida por RDE. Sin embargo, nuestros resultados sobre el ICH no confirmaron dicha hipótesis, a pesar de evidenciar una reducción significativa del área esofágica superficial dañada (ILE). Considerando la primicia de este reporte, no descartamos la posibilidad de continuar profundizando en estos estudios con vistas a poder llegar a conclusiones

más convincentes.

La administración de AINEs reduce el riesgo de cáncer en los órganos gastrointestinales incluyendo el esófago, estómago y colo-rectal (Brown *et al*, 2009; Farrow *et al*, 1998). Estudios preclínicos, previos, han sugerido que la indometacina y otros AINEs pueden poseer actividad anticancerígena (Thun *et al*, 2012), mientras que estudios *in vitro* han demostrado que la indometacina promueve la apoptosis de HCT116 línea de células de cáncer de colon (Kohli *et al*, 2004) y de células EC109 de línea celular de cáncer esofágico (Qin *et al*, 2015). Otro estudio *in vivo* ratificó que la aplicación de indometacina en forma de disolución disuelta en el agua de bebida de los animales con RDE, redujo a los cuatro meses de evolución el porcentaje de animales que desarrollaron metaplasia, displasia y adenocarcinoma esofágico en el modelo de RDE (Esquivias *et al*, 2012), asociado a una reducción de los niveles de PGE₂.

Contradictoriamente, nuestros resultados no se corresponden con los anteriores, pues los animales que recibieron indometacina (2 mg/kg) por vía oral mediante gavage, si bien redujo significativamente el área esofágica dañada (35,6 %), no produjo cambios significativos en cuanto al desarrollo de los cambios histológicos de EB hacia ADC, ya que el 85 % de los animales presentaron ADC característicos de la esofagitis crónica inducida por RDE de 16 semanas de evolución (tabla 2), resultado que no se corresponde con los alcanzados por Esquivias *et al*. (2012).

De forma similar, el tratamiento con OMP (20 mg/kg), clásico IBP, capaz de reducir algunos componentes de los AB refluidos (Sital *et al*, 2006), acción que sustenta su uso como fármaco de referencia, redujo significativamente (50 % de inhibición) el ILE, respecto al grupo control positivo, sin que esto implicara cambios significativos en cuanto al ICH, a diferencia de lo evidenciado en el modelo de RDE de 14 días de evolución (Noa *et al*, 2016).

Los AB presentes en el contenido duodenal refluido hacia el esófago son cruciales en la transformación patológica de EB en ADC, ya que activan la proteína quinasa C que induce la transcripción génica para la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX- 2) (Hashimoto, 2012). Considerando que la enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2) se encuentra involucrada en el desarrollo de la esofagitis (Sital *et al*, 2006; Piazuelo *et al*, 2012) inducida por RDE, se puede sugerir que la acción beneficiosa del D-002 pudiera estar, en parte, determinado por su efecto antiinflamatorio⁵⁴ mediado por la inhibición de esta enzima (Sharman *et al*, 2003), afirmación que debe ser demostrada en estudios posteriores de RDE.

Sin embargo, los resultados histológicos no sustentan esta vía de acción del D-002 sobre la progresión del EB hacia ADC ya que el 63 % de los animales tratados con D-002 presentaron formación de carcinomas escamoso; no evidenciándose así la reversión de la progresión del EB hacia ADC por parte del tratamiento oral con D-002. Este resultado nos sugiere que otros mecanismos involucrados en este proceso no son modificables por el D-002, si bien estudios posteriores deberán profundizar en este sentido. Hasta el momento, las evidencias indican que el D-002 es capaz de ejercer una protección sobre la mucosa esofágica frente a la esofagitis inducida por el RGE agudo y crónico (Zamora *et al*, 2014; Zamora *et al*, 2015a) y por el RDE crónico (14 días) (Zamora *et al*, 2015b). Sin embargo, no fue capaz de proteger la

esofagitis inducida por el reflujo duodeno gastro-esofágico (RDGE) (Zamora *et al*, 2015b) donde el daño es potencialmente mayor dada la presencia de reflujo ácido y biliar (mixto) (Aak *et al*, 2008).

En correspondencia con estos resultados, el presente estudio demostró que el daño histológico inducido por el RDE durante 16 semanas, caracterizado por la formación de EB (metaplasia intestinal) como fase inicial de la progresión del tejido hacia la formación de ADC y carcinoma escamoso, fue de tal severidad que los mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes del D-002, no fueron suficientes como para revertirlos. Sin embargo, el tratamiento con D-002 redujo significativamente la extensión del área esofágica lesionada (ILE), evaluada macroscópicamente, sin que existieran diferencias significativas con respecto a las dos sustancias de referencias empleadas en el estudio (OMP e indometacina).

Por lo tanto, consideramos que el D-002 es un producto natural, con efectos antioxidantes y antiinflamatorios, efectivo y eficaz contra los procesos inflamatorios esofágicos ya sea administrado solo o en combinación; independientemente de que el D-002 no haya evidenciado reversión del progreso del daño histológico de la esofagitis hacia la formación de ADC inducida por RDE evaluado a las 16 semanas, máxime si tenemos en cuenta que si demostró reducir la extensión del área dañada y que antecedentes previos han demostrado los beneficios del tratamiento con D-002 sobre la esofagitis.

CONCLUSIONES

La administración oral de D-002 puede ser utilizado como tratamiento a largo plazo en la esofagitis por reflujo duodenal, a pesar de no revertir la progresión de los cambios histológicos del tejido esofágico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aak, N.G., Mostaza, M., Salah, T., El-Hemaly, M., Haleem, M., Abd El-Rauf, A., & Hamdy, E. (2008). Acid and bile reflux in erosive disease, non –erosive reflux disease and barret’s esophagus. *Hepatogastroenterology*, 55(82-83), 442-447.
- Brown, W.A., Skinner, S.A., Malcontenti-Wilson, C., Vogiagis, D., & O’Brien, P.E. (2009). Non-steroidal anti-inflammatory drugs with activity against either cyclooxygenase 1 or cyclooxygenase 2 inhibit colorectal cancer in a DMH rodent model by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation. *Gut*, 48,660-666.
- Chang, S.H., Ai, Y., Breyer, R.M., Lane, T.F., & Hla, T. (2005). The prostaglandin E₂ receptor EP₂ is required for cyclooxygenase 2-mediated mammary hyperplasia. *Cancer Res*, 65, 4496–4499.
- Duman, M., Özer, M., Reyhan, E., Demirci, Y., Atıcı, A.E., Dalgıç, T., *et al.* (2011). In vitro effect of pantoprazole on lower esophageal sphincter tone in rats. *World J Gastroenterol*, 17, 5105-5109.
- Duman, M., Polat, E., Ozer, M., Demirci, Y., Yasar, N.F., Akyuz, C., *et al.* (2013). The Effect of Rabeprazole on LES Tone in Experimental Rat Model. *J Invest Surg*, 26(4),186-190.
- Esquivias, P., Morandiera, A., Escartín, A., Cebrián, C., Santander, S., Esteva, F., *et al.* (2012). Indomethacin but not a selective cyclooxygenase-2 inhibitor inhibits esophageal adenocarcinogenesis in rats. *World J Gastroenterol*, 18(35), 4866-4874.

- Estêvão-Costa, J.M., Morales, L., Parri, F.J., García, X., & Albert, A. (1994). Experimental alkaline reflux esophagitis. Role of the refluxed material. *Cir Pediatr*, 7 (4),182-187.
- Farrow, D.C., Vaughan, T.L., Hansten, P.D., Stanford, J.L., Risch, H.A., Gammon, M.D., *et al.* (1998). Use of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7, 97-102.
- Garcia- Rodriguez, L.A., Ruigomez, A., & Panes, J. (2007). Use of acid-suppressing drugs and the risk of bacterial gastroenteritis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5, 1418-1423.
- Geevasinga, N., Coleman, P.L., Webster, A.C., & Roger, S.D. (2006). Proton pump inhibitors and acute interstitial nephritis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4, 597–604.
- Hashimoto, N. (2012). Expression of COX2 and p53 in Rat Esophageal Cancer Induced by Reflux of Duodenal Contents. *ISRN Gastroenterol*. 2012; 2012: 914824.
- Hoorn, E.J., van der Hoek, J., de Man, R.A., Kuipers, E.J., Bolwerk, C., & Zest, R. (2010). A case series of proton pump inhibitor-induced hypomagnesemia. *Am J Kidney Dis*, 56, 112–116.
- Jankowski, J.A., & Anderson, M. (2004). Review article: management of oesophageal adenocarcinoma -- control of acid, bile and inflammation in intervention strategies for Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther*, 20 (Suppl 5), 71–80.
- Johnson, D.A., & Levy, B.H., (2010).3rd Evolving drugs in gastroesophageal reflux disease: pharmacologic treatment beyond proton pump inhibitors. *Expert Opin Pharmacother*, 11, 1541–1548.
- Kahrilas, P.J., Hughes, N., & Howden, C.W. (2011). Response of unexplained chest pain to proton pump inhibitor treatment in patients with and without objective evidence of gastro-oesophageal reflux disease. *Gut*, 60, 1473-1478.
- Kahrilas, P.J., Shaheen, N.J., Vaezi, M.F., Hiltz, S.W., Black, E., Modlin, I.M., *et al.* (2008). American Gastroenterological Association medical position statement on the management of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology*, 135,1392-1413.
- Kauer, W.K., & Stein, H.J. (2010). Emerging concepts of bile reflux in the constellation of gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Surg*, 14 Suppl 1,S9–S16.
- Kohli, M., Yu, J., Seaman C., *et al.* (2004). SMAC/Diablo-dependent apoptosis induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 16897-16902.
- Leedham, S., & Jankowski, J. (2007). The evidence base of proton pump inhibitor chemopreventative agents in Barrett's esophagus--the good, the bad, and the flawed! *Am J Gastroenterol*, 102, 21-23.
- Li, G., Yang, T., & Yan, J. (2002). Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 299, 886-890.
- Mas, R. (2001). D-002: A product obtained from beeswax. *Drugs of Future*, 26, 731-744.
- Miyashita, T., Miwa, K., Fujimura, T., Ninomiya, I., Fushida, S., Shah, F.A., *et al.* (2013). The severity of duodeno-esophageal reflux influences the development of different histological types of esophageal cancer in a rat model. *Int J Cancer*,

- 7,1496-1504.
- Noa, M., Mas, R., Mendoza, S., Zamora, Z., Molina, V., & Valle, M. (2016). D-002 Ameliorates Histological Changes in Rats with Bile Reflux-Induced Esophagitis. *International Journal of Pharmacology, Phytochemistry and Ethnomedicine*, 6, 72-81.
- Orel, R., & Vidmar, G. (2007). Do acid and bile reflux into the esophagus simultaneously? Temporal relationship between duodenogastro-esophageal reflux and esophageal pH. *Pediatr Int*, 49, 226-231.
- Orlando, L.A., Lenard, L., & Orlando, R.C. (2007). Chronic hypergastrinemia: causes and consequences. *Dig Dis Sci*, 52, 2482–2489.
- Oyama, K., Fujimura, T., Ninomiya, I., Miyashita, T., Kinami, S., Fushida, S., Ohta, T. (2007). Cyclooxygenase (COX)-2 expression in a rat duodeno-esophageal reflux model and chemoprevention of adenocarcinoma by the selective COX-2 inhibitor nimesulide. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 104 (8), 1183-1191.
- Pace, F., Riegler, G., de Leone, A., Dominici, P., & Grossi, E. (2011). The EMERGE Study Group. Gastroesophageal reflux disease management according to contemporary international guidelines: A translational study. *World J Gastroenterol*, 7(17), 1160–1166.
- Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I.L., Pavelka, M., Baatar, D., & Tarnawski, A.S. (1995). Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med*, 8, 289-293.
- Peng, C., Jian-Sheng, L., Jun, G., Lian-Feng, Z., & Rong-Zhong, C. (2011). Effects of refluxate pH values on duodenogastroesophageal reflux-induced esophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*, 17(25), 3060-3065.
- Pera, M., Manterola, C., Vidal, O., & Grande, L. (2005). Epidemiology of esophageal adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 92, 151-159.
- Pérez, Y., Oyarzábal, A., Ravelo, Y., Mas, R., Jiménez, S., & Molina, V. (2014). Inhibition of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase enzymes by D-002 (beeswax alcohols). *Curr Top Nutr Res*, 12(1/2), 13-18.
- Peters, J.H., & Avisar, N. (2010). The molecular pathogenesis of Barrett's esophagus: common signaling pathways in embryogenesis metaplasia and neoplasia. *J Gastrointest Surg*, 14 Suppl 1, S81–S87.
- Piazuelo, E., Santander, S., Cebrián, C., Jiménez, P., Pastor, C., García-González, M.A., et al. (2012). Characterization of the prostaglandin E2 pathway in a rat model of esophageal adenocarcinoma. *Curr Cancer Drug Targets*, 12(2), 132-143.
- Qin, S., Xu, C., Li, S., Yang, C., Sun, X., Wang, X., et al. (2015). Indomethacin induces apoptosis in the EC109 esophageal cancer cell line by releasing second mitochondria-derived activator of caspase and activating caspase-3. *Molecular Medicine Reports*, 11, 4694-4700.
- Rubenstein, J.H., Morgenstern, H., Appelman, H., et al. (2013). Prediction of Barrett's esophagus among men. *American Journal of Gastroenterology*, 108, 353-62.
- Selvan, B., Ramachandran, A., Korula, A., Amirtharaj, G.J., Kettimuthu, K., Nair, S., et al. (2012). Low dose aspirin prevents duodeno-esophageal reflux induced mucosal changes in wistar rat esophagus by MAP kinase mediated pathways. *Int J Surg*, 10 (2), 73-79.
- Shaheen, N.J., Crosby, M.A., Bozyski, E.M., & Sandler, R.S. (2000). Is there publication bias in the reporting of cancer risk in Barrett's esophagus?

- Gastroenterology*, 119 (2), 333–338.
- Sharma, S., Stolina, M., Yang, S.C., Baratelli, F., Lin, J.F., Atianzar, *et al.* (2003). Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 961-968
- Sifrim, D., & Zerbib, F. (2012). Diagnosis and management of patients with reflux symptoms refractory to proton pump inhibitors. *Gut*, 61, 1340-1354.
- Sikkema, M., de Jonge, P.J.F., Steyerberg, E.W., & Kuipers, E.J. (2010). Risk of esophageal adenocarcinoma and mortality in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 8(3):235-244.
- Siller-Matula, J.M., Spiel, A.O., Lang, I.M., Kreiner, G., Christ, G., & Jilma, B. (2009). Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J*, 157(1),148. e1-5
- Sital, R.R., Kusters, J.G., De Rooij, F.W., Kuipers, E.J., & Siersema, P.D. (2006). Bile acids and Barrett's oesophagus: a sine qua non or coincidence? *Scand J Gastroenterol. Suppl* 243,11-17.
- Song, J.H., Han, Y.M., Kim, W.H., Park, J.M., Jeong, M., Go, E.J., *et al.* (2016). Oxidative stress from reflux esophagitis to esophageal cancer; the alleviation with antioxidants. *Free Radic Res*, 50(10), 1071-1079.
- Thongon, N., & Krishnamra, N. (2011). Omeprazole decreases magnesium transport across Caco-2 monolayers. *World J Gastroenterol*, 17, 1574–83.
- Thun, M.J., Jacobs, E.J., & Patrono, C. (2012). The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol*, 9, 259-267.
- Tsuji, M., & DuBois, R.N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83, 493-501.
- Tsuji, M., Kawano, S., & DuBois, R.N. (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci*, 94, 3336-3340.
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., & DuBois, R.N. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, 93, 705-716.
- Yang, Y.X., Lewis, J.D., Epstein, S., & Metz, D.C. (2006). Long-term proton pump inhibitor therapy and risk of hip fracture. *JAMA*. 296, 2947-2953.
- Yoshida, S., Nii, M., & Date, M. (2011). Effects of omeprazole on symptoms and quality of life in Japanese patients with reflux esophagitis: Final results of OMAREE, a large-scale clinical experience investigation. *BMC Gastroenterol*, 11, 15.
- Zamora, Z., Molina, V., Mas, R., & Ravelo, Y. (2015b). Effects of D-002 (Beeswax Alcohols) on Esophagitis Induced by Duodeno-esophageal and Duodenogastroesophageal Reflux in Rats. *International Journal of Pharmacology & Toxicology*, 5(3),146-151.
- Zamora, Z., Molina, V., Mas, R., Ravelo, Y., Pérez, Y., & Oyarzabal, A. (2014). Protective effects of D-002 on experimentally induced gastroesophageal reflux in rats. *World J Gastroenterol*, 20, 2085-2090.
- Zamora, Z., Molina, V., Mas, R., Ravelo, Y., Pérez, Y., Oyarzabal, A., *et al.* (2015a). D-002 treatment attenuates esophagitis in a model of chronic gastro-esophageal reflux in rats. *IOSR Journal of Pharmacy*, 5(9), 36-40.

- Zhang, F., Altorki, N.K., Wu, Y.C., Soslow, R.A., Subbaramaiah, K., & Dannenberg, A.J. (2001). Duodenal reflux induces cyclooxygenase-2 in the esophageal mucosa of rats: evidence for involvement of bile acids. *Gastroenterology*, 121, 1391-1399.
- Zhang, T., Su, L.W., Zhu, Y.F., Lang, H.J., Zhang, F., Zhou, Y.A., *et al.* (2012). An experimental study on chemoprevention of esophageal adenocarcinoma by celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *ZhonghuaWei Chang WaiKeZaZhi*, 15(5), 512-516.