

Interrupção do Ciclo Celular com Aumento da Apoptose de Células de Câncer Induzido por Hiperosmolalidade com Cloreto de Sódio Hipertônico: relato de caso e revisão da literatura

Cell Cycle Arrest with Increased Cancer Cell Apoptosis Induced by Hyperosmolality with Hypertonic Sodium Chloride: case report and literature review

Felippe Junior J, Prof. Dr. ¹.

Instituto Brasileiro de Medicina Biomolecular

Resumo

A hiperosmolalidade intersticial, produzida pelo cloreto de sódio hipertônico, provoca elevação das espécies reativas tóxicas de oxigênio, inibição da replicação e transcrição do DNA e RNA, lesão do citoesqueleto, despolarização da membrana mitocondrial, ativação da família MAP quinase e STAT3, ao lado de aumentar a atividade transcripcional do TonEBP/OREBP o qual eleva a concentração dos osmólitos orgânicos citoplasmáticos, efeitos que, em conjunto, promovem a parada do ciclo celular proliferativo com aumento da apoptose da células neoplásicas. Relato de caso de carcinomatose peritoneal por mesotelioma, onde se administrou NaCl hipertônico e osmólitos orgânicos, encontra-se assintomático por 18 meses e com ressonância nuclear magnética normal.

Unitermos

Hiperosmolalidade intersticial, Câncer, Mesotelioma peritoneal, Indução da apoptose, Osmólitos citoplasmáticos, Cloreto de sódio hipertônico.

Abstract

The interstitial hyperosmolality produced by hypertonic sodium chloride causes elevation of toxic reactive species of oxygen, inhibition of replication and transcription of DNA and RNA, lesion of the cytoskeleton, mitochondrial membrane depolarization, activation of MAP kinase and STAT3, along with the augment of transcriptional activity of TonEBP / OREBP, which increases the concentration of cytoplasmatic organic osmolytes, which together promote cell cycle arrest with increased apoptosis of neoplastic cells. We report a case of peritoneal carcinomatosis by mesothelioma in which was administered hypertonic NaCl and organic osmolytes, with the patient remaining asymptomatic for 18 months and with normal MNR.

Key Words

Interstitial hyperosmolality, Cancer, Peritoneal mesothelioma, Apoptosis induction, Cytoplasmatic osmolytes, Hypertonic sodium chloride.

¹Prof. Dr. José de Felipe Junior - Doutor em Ciências pela Universidade de São Paulo, em 1978. Livre - Docente de Clínica Médica – Medicina Intensiva pela Universidade do Rio de Janeiro, em 1990. Consultor do Conselho Federal de Medicina da Estratégia Biomolecular – Resolução 1500/98. Especialidades: Medicina Intensiva, Nutrologia, Clínica Médica. Autor do Primeiro trabalho na literatura médica sobre: Treatment of refractory hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections. Lancet. 1980; Nov 8;2(8202):1002-4. Felippe J Jr, Timoner J, Velasco IT, Lopes OU, et al.

Correspondência: R. Conde de Porto Alegre, 1985 - São Paulo - Campo Belo CEP: 04608-003. Tel: (11) 5543-8833/5536-0433 . FAX: (11) 5533-9959. E-mail: gadi1@terra.com.br Site: www.medicinacomplementar.com.br

INTRODUÇÃO

Por definição ocorre hiperosmolalidade intersticial quando um soluto acrescentado ao meio provoca efluxo osmótico de água da célula, reduzindo o seu volume. Isto requer gradiente de atividade do soluto através da membrana celular que deve ser permeável à água e impermeável ao soluto (Burg-1995)¹. A água que se movimenta é a água tipo A, osmoticamente ativa ou água de alta densidade,

pois a água tipo B de baixa densidade é osmoticamente inativa e está na intimidade das biomoléculas formando pontes de hidrogênio estruturais (Felippe-2008)².

As células com alto conteúdo de água osmoticamente ativa, como as células transformadas e as neoplásicas, apresentam rápido efluxo de água do citoplasma para o interstício, quando colocadas em meio hipertônico. Elas diminuem de volume e a concentração dos componentes intracelulares se eleva. Cessa o aumento relativo da água tipo A de alta densidade e começa a predominar a água ligada às proteínas, macromoléculas, DNA, RNA, membrana celular e membrana mitocondrial, que é a água tipo B, de baixa densidade.

Descrivemos caso clínico de mesotelioma com carcinomatose abdominal onde empregamos solução hiperosmolar de cloreto e sódio, com carga osmolar de 1000 milioSm em 1 hora de infusão intravenosa e intraperitoneal.

REVISÃO DA LITERATURA

Cloreto de Sódio Hipertônico - O NaCl é o principal determinante da tonicidade do fluido extracelular e embora a membrana seja permeável ao Na⁺, a bomba Na-K-ATPase transporta continuamente e ativamente o Na⁺ para fora das células, o que mantém o volume celular em equilíbrio. Nas condições de hiperosmolalidade, a bomba Na-K-ATPase não aumenta a atividade porque ela já trabalha no seu limite máximo e isto acontece mesmo nas condições de isoosmolalidade (Wehner-2002)³.

As células, quase universalmente, respondem ao estresse da hiperosmolalidade acumulando osmólitos orgânicos compatíveis, o que permite manter o volume celular em equilíbrio (Burg-1995)¹. A regulação do volume celular através dos osmólitos orgânicos é fenômeno biológico universal, porque através dele foi dado um grande passo na evolução, a passagem da vida do meio aquoso para o terrestre, onde somente sobreviveram os organismos que conseguiram obter e manter mecanismos contra a dessecação.

A revisão de Burg e Ferraris de 2007⁴ mostra cerca de 200 componentes celulares que se alteram com a hiperosmolalidade intersticial, dos quais mostramos os principais de uma maneira didática e dinâmica. Os efeitos imediatos de 0 a 1 hora do aumento da osmolalidade intersticial provocam: diminuição do volume celular, aumento da força iônica intracelular, diminuição da transcrição e da translação do DNA, aumento de lesões do DNA, aparecimento de estresse oxidativo, com oxidação protéica e lipídica e parada do ciclo celular proliferativo.

No processo de adaptação, que dura de 0 a 20 horas, acontece: acúmulo de osmólitos orgânicos no citoplas-

ma, começa a restauração do volume celular, inicia o aumento da expressão de genes selecionados de proteção e de sobrevivência, permanecem as lesões do DNA, continua o aumento de radicais livres com oxidação protéica e lipídica e é mantida a parada do ciclo celular.

No final da adaptação, o volume celular volta ao normal, a força iônica é restaurada, a transcrição e da translação apresentam restauração plena, as lesões do DNA e o estresse oxidativo permanecem ainda por algum tempo e o ciclo celular proliferativo se normaliza.

Ciclo Celular - A elevação aguda do cloreto de sódio ou da uréia produz rápida parada do ciclo celular proliferativo. As células em fase G1 do ciclo celular não seguem em frente e não replicam o DNA. Aquelas em fase S param de replicar seu DNA e as em fase G2 não se dividem (Michea-2000)⁵.

A parada do ciclo celular permite que as células se adaptem à alta osmolalidade, acumulando osmólitos orgânicos no citoplasma e aumentando a expressão das proteínas "heat shock", que juntas contra balanceiam a alta osmolalidade do interstício. Se não houver esta adaptação protetora, as células entram em apoptose.

Apoptose - A morte celular programada (*i.e.*, apoptose) acontece quando a osmolalidade excede determinado ponto, com as células exibindo as clássicas características de apoptose: o DNA se condensa e aparecem corpúsculos apoptóticos, a seguir o DNA se fragmenta e a fosfatidilserina é exposta na superfície celular (Michea-2000)⁵. A apoptose acontece pelos dois mecanismos conhecidos, via mitocondrial (intrínseca) e via receptores da morte (extrínseca).

DNA e RNA - A elevação aguda da osmolalidade de 300 para 500-600 mosmol/KgH₂O com a adição de NaCl em células mIMCD3 (células da medula renal), provoca lesão do DNA acompanhada por parada do ciclo celular. Entretanto, neste período de parada do ciclo celular não há reparação do DNA (Dmitrieva-2002-2003)^{6,7}. Apesar da presença de lesões do DNA, as células adaptadas proliferam rapidamente e não apresentam apoptose. Com o tempo, o DNA é parcialmente reparado. Tudo isso acontece nas células da medula renal, células que estão acostumadas a sobreviver em meio hipertônico.

Em outros tipos de células, o aumento agudo do NaCl no interstício celular inibe a síntese de DNA, de RNA e de proteínas, por afetar a transcrição e a translação. Nas células HeLa do carcinoma cervical humano a hipertonidade rápida e de modo reversível inibe a síntese de RNA (Robbins-1970)⁸.

Despolarização Mitocondrial - Nas células mIMCD3 o aumento da osmolalidade para 700 mosmol/KgH₂O

com NaCl provoca despolarização mitocondrial com liberação de NADH, mas não de citocromo-c e não ocorrem alterações estruturais na mitocôndria. O aumento da osmolalidade para somente 500 mosmol/KgH₂O nada provoca (Michea-2002)⁹.

Nas células Vero (células epiteliais de rim de macaco africano) o aumento do NaCl provoca rápida despolarização mitocondrial com indução da caspase-3, mesmo com níveis inferiores de osmolalidade (Copp-2005)¹⁰.

Radicais Livres - Outro aspecto da hiperosmolalidade pela elevação do NaCl ou da uréia é o aumento da geração de radicais livres com a produção de franco estresse oxidativo. A hipertonicidade por aumento de NaCl aumenta a produção de radicais livres de oxigênio mitocondriais que contribuem para a ativação do TonEBP/OREBP (Zhou-2006)¹¹

Nos tecidos em hipóxia, onde predomina a glicólise anaeróbica, como na medula renal e no câncer, espera-se que o estresse oxidativo seja menor.

Citoesqueleto - A hiperosmolalidade induz polimerização da F-actina e remodelação do citoesqueleto de actina (Yamamoto-2006)¹². A hipertonicidade induz a ativação de um conjunto de sinais nos membros da família MAP kinase (MEKK3, MKK3 e p38), sendo que a p38 contribui para ativação do fator de transcrição osmoprotetor, TonEBP/OREBP (Uhlík-2003)¹³. Desta forma, o citoesqueleto é um dos intermediários da célula que contribui para a osmoproteção.

Resumindo, a hipertonicidade provocada pelo aumento do NaCl intersticial eleva as espécies reativas de oxigênio, provoca reajustes do citoesqueleto, inibe a replicação e a transcrição do DNA, inibe a translação, despolariza a membrana mitocondrial e lesa DNA, RNA e proteínas. As células se acomodam por meio da acumulação de osmólitos orgânicos e aumento da produção de proteínas "heat shock". A falha em obter essa acomodação provoca a morte celular por apoptose (Burg-2007)⁴.

MECANISMOS CELULARES DE RESPOSTA À HIPEROSMOLALIDADE

A Hiperosmolalidade Intersticial Provoca Acúmulo de Osmólitos Orgânicos - As células respondem à redução volumétrica osmótica colocando em ação mecanismos de RVI (*Regulatory Volume Increase*), que ativam transportadores que promovem o rápido influxo de íons inorgânicos que aumentam o influxo de água restauradora do volume celular. Os mecanismos de RVI restauram o volume celular quase ao normal em minutos. Entretanto, a concentração de íons no citoplasma aumenta consideravelmente: isto é, a força iônica fica muito alta.

Este não é um estado muito saudável, porque a força iônica perturba as macromoléculas citoplasmáticas (Yancey-1982)¹⁴.

Continuando o processo, em horas ocorre o aumento de osmólitos orgânicos no meio intracelular, o que reduz gradualmente a força iônica aos seus valores do estado normotônico, enquanto mantém o volume celular normal. Os osmólitos orgânicos, dependendo do tipo, estabilizam as proteínas citoplasmáticas (Yancey-1982)¹⁴. Na medula renal, no fígado e em outros tecidos, os osmólitos orgânicos estabilizadores das estruturas celulares são o sorbitol, trimetilglicina (betaína), inositol, taurina e glicerofosfocolina (Bagnasco-1986)¹⁵.

A Hiperosmolalidade Aumenta a Ativação do Fator de Transcrição Nuclear TonEBP/OREBP - O TonEBP/OREBP, também chamado de NFAT5, é membro da família Rel de ativadores transcripcionais, como são os fatores nucleares kappaB (NFkappaB) e os fatores nucleares das células T ativadas (NFATs). TonE (*tonicity-responsive enhancer*) e ORE: (*osmotic response element*) estão contidos no gene que codifica o TonEBP/OREBP. (BP significa: *Binding Protein*). TonEBP/OREBP é o responsável pela transativação de vários genes responsáveis pelo acúmulo intracelular de osmólitos orgânicos dependentes da tonicidade do meio intersticial (sorbitol, betaína, inositol, taurina e glicerofosfatidilcolina). É o responsável, também, por ativar genes osmoprotetores como os codificadores das HSP70 (heat shock proteins), AQP2 (aquaporin-2), UT-A1 (vasopresin-activated urea transporters), etc. (Ferraris-1994)¹⁶.

As HSP70 são proteínas chaperones, isto é, "protetoras"; neste caso, osmoprotetoras contra os aumentos de NaCl e uréia, enquanto as aquaporinas-2 aumentam a permeabilidade da membrana celular à água. A UT-A1 recicla a uréia, sendo importante apenas nas células da medula renal.

RESPOSTA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS À HIPEROSMOLALIDADE

Nas células do carcinoma cervical humano a hipertonicidade aumenta a expressão do RNA mensageiro do TonEBP/OREBP (Ko-2000)¹⁷. O aumento é passageiro e o pico acontece em algumas horas. Em células HepG2 do carcinoma hepático, a hipertonicidade provocada pelo NaCl transloca o TonBp/OREBP para o núcleo e desencadeia as suas funções osmoprotetoras (Zhang-2005)¹⁸.

Estes efeitos também ocorrem em outras linhagens de células cancerosas, porque trata-se de fenômeno universal de resposta à hipertonicidade intersticial que foi adquirido no grande passo da Evolução há milhões de anos atrás.

Regulação do Fator de Transcrição Nuclear TonEBP/OREBP - A regulação da atividade transcripcional do TonEBP/OREBP é complexa. Em 30 minutos de hipertonicidade o TonEBP/OREBP se torna fosforilado e se transloca para o núcleo (Ko-2000, Michea-2000)^{17,5}. Algumas horas mais tarde, aumentam o RNA mensageiro do TonEBP/OREBP e a sua respectiva proteína. Várias proteínas kinases contribuem para o aumento da atividade do TonEBP/OREBP, induzida pela hipertonicidade: p38 MAPK (Ko-2002), Fyn (Ko-2002)¹⁹, ATM - ataxia telangectasia-mutated kinase (Irrarrazabal-2004)²⁰ e PKAc -cAMP-dependente kinase A- (Ferraris-2002)²¹. Lembremos que nenhuma destas proteínas kinases é suficiente para sozinha provocar plena ativação do TonEBP/OREBP.

P38 - O aumento do NaCl intersticial rapidamente ativa o p38 MAPK tipo alfa por fosforilação. A hipertonicidade ativa esta MAPK (mitogen-activated protein kinase), a qual ativa o TonEBP/OREBP. A inibição da p38 por agentes químicos reduz a ativação da TonEBP/OREBP induzida pela hipertonicidade (Ko-2002)¹⁹.

cAMP-dependente Kinase A - O aumento de NaCl intersticial ativa esta kinase, a qual ativa o TonEBP/OREBP.

ATM - O aumento do NaCl intersticial ativa a ATM, a qual ativa o TonEBP/OREBP. A ATM aumenta a fosforilação do p53 em resposta às lesões do DNA (Banin-1998)²².

Devemos nos lembrar que a ouabaina (estrofantina G), assim como todos os inibidores da Na-K-ATPase atenuam a produção de radical superóxido induzida pelo aumento de NaCl e inibem a atividade transcripcional do TonEBP/OREBP.

STAT 3 na Carcinogênese e Regulação Osmótica - A principal proteína da família STAT, STAT 3, possui papel relevante na carcinogênese. Ela encontra-se no citoplasma em forma inativa e, como a maioria das proteínas envolvidas na gênese do câncer, é ativada por fosforilação. Uma vez ativa, ela desencadeia a proliferação celular, se houver energia proveniente da glicólise anaeróbia e impedimento da fosforilação oxidativa.

STAT 3 não funciona sozinha na sinalização da carcinogênese; ela se comunica com vários outros fatores de transcrição (*cross-talk*) como: PPAR-gama, Beta-catequina, NF-kappaB, fator induzido pela hipoxia-1alfa (HIF-1), c-myc, c-fos, c-jun, receptores dos glicocorticóides e receptores de estrógenos.

A hiperosmolalidade acelera a degradação da STAT 3 em células H4IIE do hepatoma de rato e dificulta a carcinogênese, enquanto a hipoosmolalidade estabiliza STAT 3 e facilita a proliferação mitótica (Lornejad-Schafer-2005)²⁵.

Hipoosmolalidade - Em meio hipotônico, quando a célula “incha”, abre-se um canal de anions que permite o efluxo de solutos. Estes canais volume-sensíveis são conhecidos como VSOAC (*volume-sensitive organic osmolyte/anion channel*). Estes canais são encontrados no sistema nervoso central, tanto em células tumorais como em astrócitos e células gliais normais da substância branca e cinzenta, bem como em outros tecidos do organismo (Jackson-1997)²⁴.

Enquanto a hiperosmolalidade provoca parada da proliferação celular, a hipoosmolalidade promove efeitos opostos. Em células do hepatoma humano HepG2, colocadas em meio hipoosmolar (160 mOsm/l), ocorre aumento da proliferação celular mitótica, explicada pelo autor pelo aumento da ativação da proteína kinase B via AP-1 (activator protein-1) (Kim-2001)²⁵.

Nas células do hepatoma de rato H4IIE a hipoosmolalidade induz aumento sustentado da atividade do NF-kappaB, um fator de transcrição nuclear que aumenta a proliferação celular, enquanto que a hiperosmolalidade possui poucos efeitos sobre o NF-kappaB (Michalke-2000)²⁶. Neste mesmo tipo de células, a hipoosmolalidade estabiliza o STAT 3 e facilita a proliferação mitótica (Lornejad-Schafer-2005)²⁵.

TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS AUMENTANDO A OSMOLALIDADE INTERSTICIAL

A capacidade de manter os osmólitos citoplasmáticos em uma certa concentração ideal permitiu a passagem da vida do meio aquoso para o terrestre, o que se constitui em um dos mecanismos mais importantes e poderosos na manutenção da vida da célula fora dos oceanos primordiais.

O primeiro estudo que encontramos na literatura sobre os efeitos do ambiente hiperosmolar em cultura de células neoplásicas, foi o de Laboissee em 1988²⁷. Este autor tratou células do câncer de cólon humano, HT29, com substância não tóxica e não absorvível, o polietilenoglicol (PEG) em concentração hiperosmótica. Em 3 semanas de tratamento, notou na cultura o aparecimento de células em franco estado de diferenciação. Quando submetidas à subcultura, estas células produziram duas linhagens diferentes de células, uma enterocítica e outra secretora de muco, ambas de caráter benigno. Laboissee cita o artigo de Steinberg e Defendi de 1982, onde o PEG restaurou as funções de diferenciação em um sistema de queratinócitos SV40 transformados.

Em cultura de células normais 3T3 e as correspondentes SV40-3T3 transformadas por Vírus de Símios, Silvotti em 1991²⁸ observou que estas últimas são mais sensíveis em diminuir sua resposta proliferativa, quando expostas

à osmolalidade de 500 mOsm/KgH₂O. A hiperosmolalidade quase não interferiu com a resposta das células normais. As células transformadas são mais sensíveis ao aumento da osmolalidade e diminuem o seu índice de proliferação porque contém maior quantidade de água osmoticamente ativa do tipo A, que é aquela que consegue sair da célula.

Corpet em 2000²⁹ também mostrou que a hiperosmolalidade diminui a proliferação celular maligna, quando verificou que o polietilenoglicol (PEG) inibiu de uma forma rápida e consistente a carcinogênese de cólon de ratos e camundongos submetidos a vários tipos de carcinógenos. Quando ratos bebem água com 5% de PEG e são injetados com um carcinógeno (azoximetano), eles diminuem em 10 vezes o desenvolvimento de tumores de cólon, em relação aos ratos controle, sem PEG. A administração de PEG por 16 dias reduz em 5 vezes o volume tumoral.

O PEG em várias concentrações, durante 2 a 5 dias, foi estudado em 4 linhagens de câncer de cólon humano: dois adenocarcinomas pobremente diferenciados (HT29 e COLO205), uma linhagem fetal (FHC) e uma linhagem diferenciada (pós-confluente Caco-2). O PEG marcadamente e de uma maneira dose-dependente inibiu a proliferação celular das linhagens mais agressivas, HT29 e COLO205, com parada do ciclo celular na fase G₀/G₁. As outras linhagens, fetal e diferenciada, não foram afetadas.

Para Dorval e colaboradores³⁰, o PEG na dieta é um extraordinário quimiopreventivo na carcinogênese do câncer colo-retal humano. Foram estudados pacientes com história de câncer colo-retal na família, com pólipos no intestino grosso, constipação, sintomas digestivos e que não estavam ingerindo antiinflamatórios. Eram 607 mulheres e 498 homens com idade média de 58,3 anos. Encontrou-se 329 pacientes com adenomas, 23 com carcinomas e 813 não apresentavam tumores na colonoscopia. A maioria dos pacientes que estava tomando PEG 4000 não apresentou tumores. A análise univariada mostrou que os pacientes que estavam ingerindo PEG 4000 apresentaram risco de câncer 50% menor, quando comparado com outros laxantes, sugerindo que este polímero atóxico e não absorvível possui grande valor na prevenção da carcinogênese colo-retal (Dorval-2006).

Estes trabalhos mostram que o efeito sobre as células cancerosas se faz pelo aumento de um parâmetro físico, a osmolalidade, independentemente de qual seja a química do soluto.

RELATO DE CASO

Tratamento do Câncer Humano com Solução Hiperosmolar de Cloreto de Sódio e Osmólitos Orgânicos - Descrevemos caso clínico de mesotelioma com carcino-

matose abdominal, onde empregamos solução hiperosmolar de cloreto e sódio, com carga osmolar de 1000 miliOsm em 1 hora de infusão intravenosa e intraperitoneal.

Paciente do sexo feminino com 63 anos de idade e história de febre a esclarecer há 3 meses. Foi tratada com antibióticos por 45 dias por suspeita de endocardite bacteriana, porém a febre persistiu. Foram extraídos todos os dentes do maxilar superior e mandíbula, porém a febre persistiu. Após 1 cápsula de naproxeno 250mg a febre cedeu. A Ressonância Nuclear Magnética mostrou espessamento do peritônio e aumento de vários linfonodos, principalmente pélvicos. A laparotomia seguida de biópsia confirmou a carcinomatose peritoneal por mesotelioma. A paciente estava em mau estado geral, com extrema exaustão, sensação de peso no corpo com grande fraqueza, quase não podendo andar, com edema generalizado, derrame pleural, ascite, instabilidade da pressão arterial, anorexia e caquexia intensa, pesando 38 kg. Nestas condições, foi considerada pelo oncologista de Hospital Universitário em estado terminal, tendo alta hospitalar com analgésicos e cuidados gerais paliativos.

Sendo a paciente considerada em estado terminal, onde os recursos da medicina convencional eram inexistentes, e após consentimento informado da paciente e dos familiares, iniciamos a administração de osmólitos cosmotropos orgânicos (trimetilglicina, taurina, inositol) e solução hiperosmolar de cloreto de sódio. Logo nas primeiras semanas, a paciente apresentou sensível melhora do estado geral e não mais necessitou de analgésicos. Após infusões intravenosas e intraperitoneais alternadas de NaCl 5,85% e a ingestão dos osmólitos, a paciente recuperou totalmente o apetite, começou a engordar 1/2kg a cada 15 dias e assumiu os deveres domésticos. Nos primeiros 6 meses de evolução, manteve quadro estável com olhar brilhante, aumento do apetite e de peso e ótimo estado geral. Nova ressonância mostrou peritônio não espessado e pequena diminuição dos linfonodos abdominais, quando comparado com o exame realizado seis meses antes, sendo compatível com ausência da carcinomatose peritoneal. Atualmente, está com 58 Kg, no 18º mês de evolução e persistem a melhora clínica e de imagem.

CONCLUSÃO

A solução hiperosmolar de cloreto e sódio merece ser melhor estudada, devido aos vários efeitos fisiopatológicos benéficos no tratamento do câncer experimental e na paciente com carcinomatose peritoneal descritos neste trabalho.

Conflito de interesses: Nada a declarar.

REFERÊNCIAS

1. Burg MB. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 1995 ; 268(6 Pt2):F983-96.
2. Felipe J Jr. A água tipo A de alta densidade promove a carcinogênese e a água tipo B de baixa densidade restaura a fisiologia e a bioenergética celular transformando as células cancerosas em células normais. Hipótese da carcinogênese. *Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar*. www.medicinacomplementar.com.br; maio de 2008.
3. Wehenr F, Lawonn P , Tinel H. Ionic mechanisms of regulatory volume increase (RVI) in the human hepatoma cell-line HepG2. *Plugers Arch* 2002; 443(5-6):779-90.
4. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular responses to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 2007 ; 87(4):1441-74.
5. Michea L, Ferguson DR, Peters EM, Andrews PM, Kirby MR, Burg MB. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F209-F218.
6. Dmitrieva NI, Bulavin DV, Fornace AJ Jr, Burg MB. Rapid activation of G2/M checkpoint after hypertonic stress in renal inner medullary epithelial (IME) cells is protective and requires p38 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 184-189.
7. Dmitrieva NI, Bulavin DV, Burg MB. High NaCl causes Mre11 to leave the nucleus, disrupting DNA damage signaling and repair. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285: F266-F274.
8. Robbins E, Pederson T, Klein P. Comparison of mitotic phenomena and effects induced by hypertonic solutions in HeLa cells. *J Cell Biol* 1970; 44: 400-416.
9. Michea L, Combs C, Peters EM, Dmitrieva N, Andrews PM, Burg MB. Mitochondrial dysfunction is an early event in high NaCl-induced apoptosis of mIMCD-3 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 282: F981-F990.
10. Copp J, Wiley S, Ward MW, van der GP. Hypertonic shock inhibits growth factor receptor signaling, induces caspase-3 activation, causes reversible fragmentation of the mitochondrial network. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C403-C415.
11. Zhou X, Ferraris JD, Burg MB. Mitochondrial reactive oxygen species contribute to high NaCl induced activation of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 ; 290(5):F1169-76.
12. Yamamoto M, Chen MZ, Wang YJ, Sun HQ, Wei Y, Martinez M, Yin HL. Hypertonic stress increases PI(4,5)P2 levels by activating PIP5Kbeta. *J Biol Chem* 2006; 281(43):32630-8.
13. Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 1104-1110.
14. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 1982; 217: 1214-1222.
15. Bagnasco S, Balaban R, Fales HM, Yang YM, Burg M. Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. *J Biol Chem* 1986; 261: 5872-5877.
16. Ferraris JD, Williams CK, Martin BM, Burg MB, Garcia-Perez A. Cloning, genomic organization, osmotic response of the aldose reductase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 10742-10746.
17. Ko BC, Turck CW, Lee KW, Yang Y, Chung SS. Purification, identification, characterization of an osmotic response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 52-61.
18. Zhang Z, Ferraris J, Irarrazabal CE, Dmitireva NI, Park JH, Burg MB. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM), a DNA damage-inducible kinase, contributes to high NaCl-induced nuclear localization of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F506-F511.
19. Ko BC, Lam AK, Kapus A, Fan L, Chung SK, Chung SS. Fyn and p38 signaling are both required for maximal hypertonic activation of the OREBP/TonEBP. *J Biol Chem* 2002; 277: 46085-46092.
20. Irarrazabal CE, Liu JC, Burg MB, and Ferraris JD. ATM, a DNA damage-inducible kinase, contributes to activation by high NaCl of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8809-8814.
21. Ferraris JD, Persaud P, Williams CK, Chen Y, and Burg MB. cAMP-independent role of PKA in tonicity-induced transactivation of tonicity-responsive enhancer/osmotic response element-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 16800-16805.
22. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, and Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 1998; 281: 1674-1677.
23. Lornejad- Schafer M. Osmotic regulation of STAT3 stability in H4IIE rat hepatoma. *FEBBS Lett* 2005; 579(25) 5791-7.
24. Jackson PS; Madsen JR. Identification of the volume-sensitive organic osmolyte/anion channel in human glial cells. *Pediatr Neurosurg* 1997; 27(6):286-91.
25. Kim RG. Hypoosmotic stress stimulates growth in HepG2 cells via protein kinase B dependent activation of activator protein-1. *J Gastrointest Surg* 2001; 5(5):546-55.
26. Michalke M, Carriers A, Schliess F, Häussinger D. Hypoosmolarity influences the activity of transcription factor NF-kappaB in rat H4IIE hepatoma cells. *FEBBS Lett* 2000; 7;465(1):64-8.
27. Laboiselle CL, Maoret J-J, Triadou N, Augeron C. Restoration by polyethylene glycol of characteristics of intestinal differentiation in subpopulations of human colonic adenocarcinoma cell line HT29. *Cancer Res* 1988; 48:2498-504.
28. Silvotti L, Petronini PG and Borghetti AF. Differential adaptive response to hyperosmolarity of 3T3 and transformed SV3T3 cells. *Exp Cell Res* 1991; 193(2):253-61.
29. Corpet DE, Parnaud G, Delverdier M, Peiffer G, Taché S. Consistent and fast inhibition of colon carcinogenesis by polyethylene glycol in mice and rats given various carcinogens. *Cancer Res* 2000; 60:3160-4.
30. Dorval E; Jankowski JM; Barbieux JP; Viguier J; Bertrand P; Brondin B; Bougnoux P; Corpet DE; Association Gastro 37. Polyethylene glycol and prevalence of colorectal adenomas. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30(10): 1196-9.