

Desvendando os Segredos do Câncer. Osmolalidade.

A Hiperosmolalidade intersticial retira água osmoticamente ativa da célula neoplásica, aumenta a geração de osmolitos kosmotropos, aumenta as pontes de hidrogênio do citoplasma e provoca diminuição da proliferação mitótica com aumento da diferenciação celular das células doentes que chamam de câncer, as quais caminham placidamente para a vida e depois para apoptose

02/02/09

ABMC - Janeiro de 2009. Desvendando os Segredos do Câncer. Hiperosmolalidade

José de Felipe Junior

"Se a Medicina Convencional não surtiu os efeitos desejados temos o direito e o dever como médicos de utilizar os recursos da Medicina Complementar"

Declaração de Helsinki

"O verdadeiro Médico coloca 100% de esforço em pacientes com apenas 1% de chance de cura"

JFJ

"Na arte de curar, deixar de aprender é omitir socorro e retardar tratamentos esperando maiores evidências científicas é ser Cientista e não Médico"

JFJ

"Em primeiro lugar sempre a Medicina Convencional"

JFJ

"Se a Medicina Convencional não proporcionou os efeitos desejados temos o direito e o dever como Médicos de utilizar todos os recursos disponíveis no momento: Medicina Complementar"

JFJ

"Nunca devemos trocar uma Medicina pela Outra, porém temos o dever de utilizar as Estratégias mais modernas da literatura médica de bom nível disponível"

JFJ

"É do médico a responsabilidade do paciente"

Declaração de Helsinque

"As enfermidades são muito antigas e nada a respeito delas mudou. Somos nós que mudamos ao aprender a reconhecer nelas o que antes não percebíamos"

Charcot

"A verdadeira causa das doenças e a MEDICINA ainda não fizeram as pazes. É porque a MEDICINA ainda é muito jovem. E o que dizer dos tratamentos"

JFJ

De acordo com a hipótese de Felipe Jr para carcinogênese :

A inflamação crônica persistente evolui em meio hipotônico devido ao edema intersticial em torno das células do sítio inflamatório o que provoca leve "inchaço celular" e a conseqüente diminuição dos osmolitos kosmotropos citoplasmáticos os quais vagarosamente provocam a mudança da água B estruturada em água A desestruturada a qual gradativamente diminui o grau de ordem-informação do sistema termodinâmico celular que ao atingir o ponto máximo suportável de entropia provoca na célula um "estado de quase morte". Neste ponto de baixa concentração de osmolitos, predomínio de água desestruturada e alta entropia celular as células se transformam e lutam para se manterem vivas e o único modo de sobreviver é através da proliferação celular. Elas colocam em ação mecanismos milenares de sobrevivência, justamente aqueles que mantiveram as células normais no Planeta durante a Evolução. Desta forma, ocorre ativação de fatores e vias de sinalização, alcalinização citoplasmática, predomínio do ciclo de Embden-Meyerhof, etc., os quais promovem a proliferação celular neoplásica, a diminuição da apoptose, a formação de novos vasos e o impedimento da diferenciação celular. O predomínio da água A no intracelular incrementa o aumento da hidratação e do volume celular provocado pela hipotonicidade do meio inflamatório. As estratégias que transformam a água A desestruturada em água B estruturada, hiperosmolaridade intersticial e osmolitos intracelulares, restauram a fisiologia e a bioenergética celular e as células neoplásicas se diferenciam em células normais e caminham para a vida e depois para o processo fisiológico contínuo de morte celular programada"(Felipe- fevereiro e maio 2008).

Sabemos que 80% dos seres vivos do Planeta vivem nos oceanos e que 97% da água do Planeta pertencem ao oceano cuja osmolalidade atual gira em torno de 1000 mOsm/KgH₂O. A osmolalidade intersticial dos mamíferos é de 300 mOsm/kgH₂O semelhante ao oceano primordial, época que éramos seres unicelulares, isto é, mantivemos a mesma osmolalidade daquele tempo remoto (Ferraris-1999-2001, Dmitrieva-2006).

No período quando a osmolalidade do oceano primordial era de 300 mOsm/KgH₂O demos o maior passo da Evolução: saímos do

meio aquoso para viver em um meio totalmente diverso, o meio não aquoso. Na evolução da espécie humana, durante a transição dos organismos primitivos do meio aquoso para o terrestre sobreviveram os organismos que sofreram mutações que proporcionaram um mecanismo vital contra a dessecação celular sem a qual os organismos não sobreviveriam em ambiente não aquoso. A proteção contra a dessecação foi proporcionada por fatores que permitiram o acúmulo citoplasmático de osmolitos orgânicos especiais ditos kosmotropos, os quais proporcionam estruturação da água intracelular com pontes de hidrogênio que mantêm a água na intimidade da estrutura das proteínas, macromoléculas, membrana celular, membrana citoplasmática, DNA e RNA. Os osmolitos orgânicos mantêm a hidratação celular – volume celular – em equilíbrio dinâmico.

Durante a evolução no oceano as células adquiriram mecanismos potentes de sobrevivência sendo o mais primitivo deles a proliferação celular mitótica que utiliza o ciclo mais antigo de produção de ATP, o ciclo de Embden-Meyerhof. No grande passo da Evolução os organismos levaram consigo esta habilidade, isto é, tal mecanismo de defesa ficou marcado firmemente em todas as células do organismo e funcionam até hoje para manter a sobrevivência dos mais diferentes tipos de linhagens celulares. Quando uma determinada linhagem de célula é submetida a uma agressão contínua ela pode chegar a um ponto máximo de sofrimento que chamamos de "estado de quase morte". Neste ponto as células param a diferenciação, descartam a pesada máquina mitocondrial de produção de energia e desencadeiam os antigos mecanismos de sobrevivência iniciando a proliferação mitótica redentora da vida: neoplasia.

No grande passo da Evolução os mecanismos cruciais de sobrevivência contra a dessecação celular também ficaram firmemente marcados em todas as linhagens de células do corpo e será nestes mecanismos que vamos basear a nossa estratégia de controle das células neoplásicas: 1- utilizando soluções hiperosmolares para retirar o excesso de água tipo A desestruturada do citoplasma neoplásico e 2- oferecendo ao ambiente neoplásico osmolitos orgânicos kosmotropos (Felippe-2007-2008).

Vamos rever os mecanismos colocados em ação pelas células normais e neoplásicas quando submetidas a um meio hipertônico, porque esta é a estratégia que podemos utilizar para retirar água desestruturada, osmoticamente ativa das células neoplásicas com a finalidade de afastá-las do "estado de quase morte" provocado pela persistente inflamação crônica sub-clínica.

O estado de hidratação celular é dinâmico e se altera em minutos sob a influência da hipo ou hiperosmolalidade, de hormônios, nutrientes e estresse oxidativo. Isto acontece em praticamente todos os tipos de células e o volume celular volta quase ao seu normal devido a atividade de potentes mecanismos de regulação do volume celular.

Pequenas flutuações da hidratação celular, isto é do volume celular, funcionam como potentes agentes de ativação de fatores e sinais para o metabolismo celular e a expressão gênica, porque faz parte de mecanismos primordiais do tempo do grande passo evolutivo de transição oceano-terra.

A membrana celular possui alta permeabilidade a água desestruturada tipo A, pobre em pontes de hidrogênio e deste modo as células funcionam como verdadeiros osmômetros "inchando" quando colocadas em meio hipotônico e "encolhendo" quando colocadas em meio hipertônico.

Por definição ocorre hipertonidade ou hiperosmolalidade quando um soluto acrescentado ao meio provoca efluxo osmótico de água da célula reduzindo o seu volume. Isto requer um gradiente de atividade do soluto através da membrana celular que deve ser permeável à água e impermeável ao soluto. A água que se movimenta é a água osmoticamente ativa ou a água tipo A desestruturada, pois a água B estruturada está na intimidade das biomoléculas formando pontes de hidrogênio estruturais.

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 desestruturada tipo A e começa a predominar a água ligada às proteínas, macromoléculas, DNA, RNA, membrana celular e membrana mitocondrial, que é a água estruturada tipo B, osmoticamente inativa.

O concomitante aumento das pontes de hidrogênio diminui a entropia, aumenta o grau de ordem-informação do sistema termodinâmico celular e retira a células neoplásicas do "estado de quase morte". Desta forma, as células neoplásicas caminham para diferenciação celular, com todos os deveres e obrigações das células normais: viver em ambiente não hostil e com o passar do tempo ter uma morte tranqüila, sem dor e sem inflamação por apoptose.

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. A bomba Na-K-ATPase não aumenta a atividade nas condições de hiperosmolalidade porque ela trabalha no seu limite máximo mesmo nas condições de iso-osmolalidade (Wehner-2002).

As células quase universalmente respondem ao estresse da hiperosmolalidade acumulando osmolitos orgânicos compatíveis, o que permite manter o volume celular em equilíbrio (Burg-1995). A regulação do volume celular através dos osmolitos orgânicos é fenômeno biológico universal porque foi através dele foi dado um grande passo na Evolução a passagem da vida do meio aquoso para o terrestre.

A revisão de Burg e Ferraris de 2007 mostra cerca de 200 componentes celulares que se alteram com a hiperosmolalidade intersticial.

Os efeitos imediatos (de 0 a 1 hora) do aumento da osmolalidade intersticial são:

1. diminuição do volume celular
2. aumento da força iônica intracelular
3. diminuição da transcrição e da translação
4. aumento de lesões do DNA
5. aparecimento de estresse oxidativo com oxidação protéica, etc
6. parada do ciclo celular proliferativo

No processo de adaptação que dura de 0 a 20 horas acontece:

1. acúmulo de osmolitos orgânicos no citoplasma
2. começa a restauração do volume celular
3. inicia o aumento da expressão de genes selecionados de proteção e de sobrevivência
4. continuam as lesões do DNA
5. continua o aumento de radicais livres com oxidação protéica, etc
6. continua a parada do ciclo celular proliferativo

Na adaptação acontece:

1. volume celular volta ao normal
2. força iônica volta ao normal
3. restauração plena da transcrição e da translação
4. as lesões do DNA permanecem por um tempo
5. continua o estresse oxidativo por algum tempo
6. o ciclo celular proliferativo se normaliza

Ciclo celular

A elevação aguda do NaCl ou 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).

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

Apoptose

A morte celular acontece quando a osmolalidade excede determinado ponto e as células exibem as clássicas características de apoptose (Bortner-1996, Galvez-2001, Michea-2000, Santos-1998). O DNA se condensa e aparecem corpúsculos apoptóticos, o DNA se fragmenta e a fosfatidilserina é exposta na superfície celular. A causa da apoptose acontece pelos dois mecanismos conhecidos, via mitocondrial (intrínseca) e via receptores da morte (extrínseca) (Jin-2005).

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 (Kultz-2001, Dmitrieva-2003) acompanhada por parada do ciclo celular. Entretanto, neste período de parada do ciclo celular não há reparação do DNA (Dmitrieva-2005). Apesar da presença de lesões do DNA as células adaptadas proliferam rapidamente e não apresentam apoptose (Capasso-2001, Santos-2003, Dmitrieva-2004). Com o tempo o DNA é parcialmente reparado. Tudo isso acontecendo nas células da medula renal, células que estão acostumadas a sobreviver em meio hipertônico.

O aumento do NaCl 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 hipertonicidade rápida e reversivelmente inibe a síntese de RNA (Robbins-1970).

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).

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

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 (Zou-2001, Zhang-1999-2004, Yang-2005, Zhou-2005). 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). 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 (Di Ciano-2002, Bustamente-2003, Yamamoto-2006). A hipertonicidade induz a ativação de um conjunto de sinais nos membros da família MAP kinase (MEKK3, MKK3 e p38). A p38 contribui para ativação do fator de transcrição osmoprotetor, TonEBP/OREBP (Uhlík-2003). Desta forma o citoesqueleto é um dos intermediários da célula que contribui para a osmoproteção.

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 e proteínas. As células se acomodam acumulando osmolitos orgânicos e aumentando a produção de "heat shock" proteínas. A falência em acomodar-se provoca a morte celular por apoptose (Burg-2007).

Osmolitos orgânicos se acumulam no citoplasma em resposta a hiperosmolalidade intersticial

As células respondem à redução volumétrica osmótica colocando em ação mecanismos de RVI ("Regulatory Volume Increase") na qual são ativados 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).

Continuando o processo, em horas começa a aumentar os osmolitos orgânicos no intracelular o que reduz gradualmente a força iônica aos seus valores do estado normotônico enquanto mantém o volume celular normal. Os osmolitos orgânicos, dependendo do tipo, estabilizam as proteínas citoplasmáticas (Yancey-1982, Street-2006).

Na medula renal, no fígado e em outros tecidos os osmolitos orgânicos que estabilizam as estruturas celulares são o sorbitol, trimetilglicina (betaína), inositol, taurina e glicerofosfolina (Bagnasco-1986, Nakanishi-1991). Todos esses fatores aumentam a água tipo B estruturada no intracelular e portanto são considerados solutos ou osmolitos kosmotropos (estruturadores). A taurina em algumas situações pode funcionar como osmolito caotrope (desestruturador).

Sorbitol.

A hipertonicidade aumenta a atividade da aldose redutase que aumenta a síntese intracelular de sorbitol a partir da glicose. Posteriormente o sorbitol se transforma em frutose pela ação da sorbitol desidrogenase. O responsável pelo aumento da transcrição da aldose redutase é o fator TonEBP/OREBP.

Betaína (trimetil-glicina)

A hipertonicidade aumenta o número de transportadores que carregam a betaína do interstício para dentro das células. Não ocorre aumento da síntese. A concentração de betaína passa de níveis micromolares para milimolares pela ação do transportador Betaína/GABA (BGT1) acoplado ao Na⁺ e Cl⁻. O fator de transcrição responsável pelo aumento do BGT1 é o fator TonEBP/OREBP.

Inositol.

A hipertonicidade aumenta os transportadores que carregam o inositol para o intracelular. Na ausência de inositol no interstício acontece a falha deste mecanismo de proteção. O transportador do inositol é o SMIT ("sodium myo-inositol transporter") que aumenta pela ação do fator de transcrição TonEBP/OREBP.

Taurina.

A hipertonicidade aumenta tanto a síntese como o transporte para dentro das células da medula renal. A taurina é sintetizada a partir da cisteína através de uma cadeia de enzimas sendo a primeira a cisteína dioxigenase. O transportador chama-se TauT.

Glicerofosfolina (GPC).

A hipertonicidade aumenta a atividade da NTE ("neuropathy target esterase"), uma fosfolipase B que catalisa a produção de GPC a partir da fosfatidilcolina.

Resumindo: a diminuição do volume celular, através da 1- alteração do citoesqueleto, 2- das lesões do DNA e 3- do aumento da geração de radicais livres de oxigênio, ativam o fator de transcrição TonEBP/OREBP o qual:

1. Aumenta a expressão da aldose redutase, que aumenta a síntese de sorbitol
2. Aumenta a expressão da SMIT, que aumenta o transporte de inositol
3. Aumenta a expressão do BGT1, que aumenta o transporte de betaína
4. Aumenta a expressão do NTE, que aumenta a síntese de GPC
5. Aumenta a expressão do TauT, que aumenta o transporte de taurina
6. Aumenta a expressão das "Heat Shock Proteins"

A hipertonicidade aumenta a ativação do fator de transcrição nuclear TonEBP/OREBP

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 trans-ativação de vários genes responsáveis pelo acúmulo intracelular de osmolitos orgânicos dependentes da tonicidade do meio intersticial: sorbitol, betaína, inositol, taurina e glicerofosfatidilcolina. É o responsável também por ativar genes osmoprotetores como as HSP70 ("heat shock proteins"), AQP2 (aquaporin-2), UT-A1 ("vasopresin-activated urea transporters"), etc. (Ferraris-1994-1999-2002, Ko-1997, Rim-1997, Ito-2004, Nakayama-2000, Woo-2002, Hasler-2005).

As HSP70 são proteínas "chaperones" isto é "protetoras" no nosso caso osmoprotetoras contra os aumentos de NaCl e uréia e 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.

Células neoplásicas

Nas células do carcinoma cervical humano a hipertonicidade aumenta a expressão do RNA mensageiro do TonEBP/OREBP (Ko-2000). O aumento é passageiro e o pico acontece em algumas horas.

Em células do carcinoma hepático Hep G2 a hipertonicidade provocada pelo NaCl transloca o TonBp/OREBP para o núcleo e desencadeia as suas funções osmoprotetoras (Zheng-2005).

Estes efeitos ocorrem em outras linhagens de células cancerosas porque ele é fenômeno universal de resposta à hipertonicidade intersticial que foi adquirido no grande passo da Evolução há milhões de ano 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 (Dahl-2001, Ko-2000, Michea-2000). 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, Sheikh-Hamad-1998), Fyn (Ko-2002), ataxia telangectasia-mutated kinase (ATM) (Irrazabal-2004), cAMP-dependente kinase A (PKAc) (Ferraris-2002), etc, e nenhuma delas é suficiente sozinha de provocar uma 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 (Zhou-2008). A inibição da p38 por agentes químicos reduz a ativação da tonEBP/OREBP induzida pela hipertonicidade (Sheikh-Hamad-1998, Nadkarni-1999, Ko-2002). Lembrar que o resveratrol, a tangeritina e o ligustilide inibem o p38 e portanto não devemos empregá-los quando usamos a estratégia hiperosmolar no tratamento do câncer (Felippe-2006).

cAMP-dependente kinase. 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).

Devemos nos lembrar que a ouabain, 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 e regulação osmótica

STAT ou "signal-transducer-and-activator-of-transcription" ou "transdutores de sinal e ativadores da transcrição" compreendem uma família de seis fatores envolvidos na transdução de sinais e na transcrição de fatores que desempenham importantes funções nas células normais do nosso organismo, tais como: resposta imune, diferenciação celular, inflamação, proliferação, regeneração e apoptose. Alguns componentes da família STAT também interferem na carcinogênese. Eles foram descobertos em 1993 por James Darnell (Shuai-1993).

A principal proteína da família, o STAT 3 possui papel relevante na carcinogênese e foi descoberto em 1994 por Darnell e por Akira trabalhando em laboratórios diferentes (Zhong e Darnell-1994; Akira-1994). Esta proteína 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.

O STAT 3 não funciona sozinho na sinalização da carcinogênese ele se comunica com vários outros fatores de transcrição como: PPAR-gama, Beta-catequina, NF-kappaB, fator induzido pela hipoxia-1 alfa (HIF-1), c-myc, c-fos, c-jun, receptores dos glicocorticóides e receptores de estrógenos (Felippe-2006).

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

A curcumina, o partenolide e o resveratrol, substâncias "sintetizadas" pela Natureza inibem o STAT 3 e dificultam a carcinogênese (Felippe-2006).

Hipoosmolalidade

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

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 (ativador protein-1) (Kim-2001).

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

De acordo com a nossa hipótese da carcinogênese a hipoosmolalidade diminui os osmolitos citoplasmáticos e aumenta a concentração de água tipo A desestruturada no intracelular o que promove o aumento da entropia e maior sofrimento das células o que ativa vias e fatores de sobrevivência celular entre eles o NF-kappaB, o STAT3 e a proteína kinase B desencadeando o aumento da proliferação celular mitótica (Felippe-maio 2008).

Tratamentos das neoplasias aumentando a água estruturada tipo B em relação à água desestruturada tipo A

A capacidade de manter os osmolitos 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 que mantém a vida da célula. Podemos considerá-lo como o "tendão de Aquiles" de sobrevivência de qualquer tipo de célula.

A estratégia de diminuir a quantidade de água tipo A desestruturada e aumentar a água tipo B estruturada das células neoplásicas, interferindo nos osmolitos, atinge o alvo, atinge o ponto fundamental e inicial do processo carcinogênico e inibe a proliferação celular, promove a apoptose, diminui a formação de novos vasos e aumenta a diferenciação celular. Esta estratégia atinge a fase inicial do processo de sofrimento persistente, atinge a ponta esquerda do processo carcinogênico (Felippe-maio 2008).

A hiperosmolalidade intersticial retira a água tipo A desestruturada do citoplasma e diminui a proliferação celular neoplásica

O primeiro estudo que encontramos na literatura sobre os efeitos de um ambiente hiperosmolar em cultura de células neoplásicas foi o de Laboisse em 1988. Este autor tratou células do câncer de colon humano, HT29, com substância não tóxica e não absorvível, o polietilenoglicol (PEG) em concentração hiperoncótica. Em 3 semanas de tratamento notou na cultura o aparecimento de células em franco estado de diferenciação. Quando submetidas a subcultura estas células produziram duas linhagens diferentes de células, uma enterocítica e outra secretora de muco, ambas de caráter benigno.

De acordo com a nossa hipótese da carcinogênese o PEG aumenta a pressão osmótica do interstício tumoral de um modo dose

dependente e retira a água do intracelular. A água retirada é a água do tipo A, desestruturada que é a osmoticamente ativa e assim aumenta a concentração relativa da água tipo B, estruturada normalizadora da função bioenergética e da entropia e as células se diferenciam.

Laboisie, cita o artigo de Steinberg e Defendi de 1982 onde o PEG restaurou as funções de diferenciação em um sistema de keratinocitos SV40 transformados.

Em cultura de células normais 3T3 e as correspondentes SV40-3T3 transformadas por Vírus de Símios observou-se que estas últimas são mais sensíveis em diminuir sua resposta proliferativa quando expostas a uma osmolalidade de 500 mOsm/KgH₂O. A hiperosmolalidade quase não interferiu com a resposta das células normais (Silvotti-1991).

De acordo com a nossa hipótese da carcinogênese 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 é retirada da célula.

A diminuição da água desestruturada do citoplasma restaura parcialmente a função fisiológica celular diminuindo a proliferação celular. Se a restauração da função fisiológica fosse total, a célula sairia do "estado de quase morte" e a proliferação seria totalmente abolida, isto é, não seria mais necessária. O mesmo acontece com as células neoplásicas que possuem alta concentração de água desestruturada, osmoticamente ativa, que apresentam efeitos marcantes quando submetidas à hiperosmolalidade, enquanto as células normais sendo ricas em água estruturada, osmoticamente inativa não apresentam tanto efeitos (Felippe-maio 2008).

Corpet em 1991 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 colon 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 colon em relação aos ratos controle, sem PEG. A administração de PEG por 16 dias reduz em 5 vezes o volume tumoral.

Ratos injetados com azoximetano foram randomizados e colocados no grupo controle ou nos vários grupos laxantes. Foram empregados vários tipos de laxantes entre eles o PEG 8000. No grupo que ingeriu PEG houve redução de 9 vezes no número de criptas aberrantes e dobrou a quantidade de células em apoptose por cripta. Outros laxantes usados (psílio, manitol, sorbitol, lactulose, propileno-glicol, hidróxido de magnésio, fosfato de sódio, óleo de parafina, polivinil-pirrolidona, poliacrilato de sódio, carboximetilcelulose, goma de karaia, bisacodil, docusato, poliacrilato de cálcio) não apresentaram o efeito de eliminar as células modificadas das lesões pré-cancerosas (Tache-2006).

O PEG é considerado forte inibidor do câncer de colon em ratos suprimindo as criptas aberrantes, entretanto uma substância PEG-like, o plurônico F68, reduz em 98.6% o número de criptas aberrantes sendo 5 vezes mais potente que o PEG, no mesmo modelo experimental (Parnaud - Corpet-2001). Ambos provocam hiperosmolalidade no interstício neoplásico.

O PEG em várias concentrações durante 2 a 5 dias foi estudado em 4 linhagens de câncer de colon humano: dois adenocarcinomas pobremente diferenciados (HT29 e COLO205), uma linhagem fetal (FHC) e uma linhagem diferenciada (pós-confluent 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 e não poderiam pois suas células são ricas em água estruturada.

O autor aumentou a osmolalidade do meio com NaCl ou sorbitol e observou os mesmos efeitos que o PEG, isto é, diminuição da proliferação celular com aumento de ácido láctico no meio de cultura (efeito "wash-out") (Parnaud - Tache-2001).

Para Dorval e colaboradores 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 anti-inflamatórios. 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 um 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 corroboram a nossa hipótese da carcinogênese porque 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.

O que está acontecendo na intimidade citoplasmática é o aumento da água estruturada das células mais doentes, células neoplásicas ou transformadas, células que estão em profundo sofrimento, com entropia positiva e baixo grau de ordem-informação da termodinâmica celular.

De fato a retirada da água tipo A desestruturada do citoplasma permite que a célula adquira suas características iniciais normais o que restabelece a entropia negativa, aumenta o grau de ordem-informação, o metabolismo passa para fosforilação oxidativa e não mais é necessária a proliferação celular. Na evolução ocorre diferenciação celular e as células "malignas" percorrem a via normal de vida com todos os direitos e obrigações de viver em ambiente não hostil, viver, viver e depois caminhar para morte sem alarde, sem dor, sem inflamação, por apoptose fisiológica (Felippe-maio 2008).

Tratamento do câncer humano com solução hiperosmolar alcalina e osmólitos kosmotropos orgânicos.

Alguns casos clínicos do Dr.Tullio Simoncini nas suas palavras:

Caso 1: Paciente com diagnóstico de neoplasia pulmonar iniciou tratamento com bicarbonato, antes de se submeter a cirurgia para remoção de parte do pulmão. O bicarbonato foi administrado oralmente, por aerosol e intravenoso. Após a primeira aplicação já notou-se evidente redução dos nódulos e após 8 meses eles não eram mais visíveis. O tratamento também reduziu o tamanho do fígado e os resultados foram confirmados por tomografia computadorizada e Raio-X.

Caso 2: Criança com 9 anos de idade foi hospitalizada e diagnosticada Sarcoma de Ewing do humero direito. Apesar de vários ciclos de quimioterapia foi necessário remover o humero. Três massas tumorais continuaram a crescer apesar dos esforços para parar a progressão. Iniciou-se o tratamento com bicarbonato de sódio por cateter em artéria subclávia direita (500 ml a 5%) para administrar a solução diretamente nas massas tumorais. Das 3 massas vistas na tomografia de 7 de maio de 2001. cujas dimensões eram de 6,5 cm, 4,4 cm e 2,4 cm somente 1 delas persistiu com 1,5 cm, com aparência de cicatriz residual, como mostrado na tomografia de 10 de setembro de 2001.

Caso 3: Paciente com 62 anos submeteu-se a cirurgia de adenocarcinoma endometrial em dezembro de 1998, seguida de ciclos sucessivos de radioterapia e terapêutica anti-hormonal. Após o espessamento do peritônio e o crescimento de vários linfonodos devido a carcinomatose a paciente piorou do estado geral, apresentou edema generalizado, meteorismo abdominal, evacuações irregulares instabilidade da pressão arterial. O tratamento com bicarbonato de sódio a 5% administrado alternadamente por cateter endoperitoneal e via intravenosa provocou rápida melhora nas condições de saúde. Uma tomografia final confirmou a regressão da carcinomatose peritoneal e a estabilização do tamanho dos linfonodos quando comparados com o ano anterior.

Caso 4: Paciente com 40 anos de idade foi submetida a mastectomia radical esquerda por carcinoma de mama há 7 meses. Depois de 3 meses de quimioterapia a paciente apresentou metástases pulmonar e hepática difusas; metástases ósseas particularmente na quinta e sexta vértebras lombares, com invasão e compressão do canal medular, o que causava dor extrema e não responsiva a qualquer tratamento. Todas as drogas supressoras da dor, incluindo a morfina, foram totalmente ineficazes e a paciente estava totalmente prostrada e incapaz de dormir. Iniciou-se o bicarbonato de sódio em injeções lombares. Ao administrar 50 ml de bicarbonato de sódio 5% lentamente via punção lombar a paciente diz ao Dr Simoncini que somente conseguiu dormir 2 horas na última semana. Após esta primeira aplicação a paciente conseguiu dormir a noite inteira. Após mais duas injeções lombares no mês seguinte a dor desapareceu completamente. As imagens de Ressonância Magnética antes e após o tratamento foram de acordo com o radiologista chefe, surpreendentes.

Conclusão

A hiperosmolalidade no meio intersticial reverte o "estado de quase morte" presente nas células neoplásicas, aumentando a concentração de água estruturada no intracelular o que reverte a alta entropia e o baixo grau de ordem – informação normalizando a bioenergética celular permitindo a diferenciação celular das células doentes, das células em profundo sofrimento que ousam chamar de câncer (Felippe- 2003,2004, 2005,2006).

Mesmo as células em sofrimento de "quase morte", células cancerosas que colocaram em ação todos as vias e fatores de sobrevivência e estão proliferando para continuarem vivas são susceptíveis de responder ao mecanismo primordial que permitiu a passagem dos organismos do meio aquoso para o terrestre: aumento dos osmolitos orgânicos citoplasmáticos quando submetidas ao estresse também primordial a HIPEROSMOLALIDADE.

No intuito mais uma vez de promoverem a sobrevivência elas em um derradeiro esforço conseguem aumentar a concentração intracelular de osmolitos orgânicos . É neste ponto , no parâmetro mais vulnerável de todas as células que conseguimos reverter esta patologia que chamam de uma palavra estigmatizada e feia, câncer. Sabemos sim que são células carne da nossa própria carne, células doentes tentando sobreviver heroicamente utilizando todos os recursos que permitiram as células normais sobreviverem durante a Evolução da nossa espécie

A todos os cientistas de bancada, que entram profundamente na intimidade das células, que trabalham com afinco nos laboratórios de pesquisa e descobrem um pedacinho do quebra-cabeça da VIDA de cada vez ; aos médicos corajosos que ousam usar de tudo para cuidar de doentes graves desenganados pela ciência convencional; todo o louvor , respeito e reconhecimento de nós simples médicos de consultório que sofremos junto com a família ao lado de pacientes desejosos de viver.

"The majority believes that everything hard to comprehend must be very profound.

This is incorrect. What is hard to understand is what is immature, unclear and often false.

The highest wisdom is simple and passes through the brain directly to the heart."

Viktor Schauberger

Referências Bibliográficas

1-**Akira, S., Y. Nishio, M. Inoue.** Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell* 77: 63-71; 1994.

2-**Bagnasco S, Balaban R, Fales HM, Yang YM, Burg M.** Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas. *J Biol Chem* 261: 5872-5877, 1986.

3-**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* 281: 1674-1677, 1998.

4-**Bortner CD, Cidlowski JA.** Absence of volume regulatory mechanisms contributes to the rapid activation of apoptosis in thymocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C950-C961, 1996.

5-**Burg MB.** Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol*; 268(6 Pt2):F983-96,1995.

6-**Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI.** Cellular responses to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev*; 87(4):1441-74,2007.

7-**Bustamante M, Roger F, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Martin PY, Feraille E.** Regulatory volume increase is associated with p38 kinase-dependent actin cytoskeleton remodeling in rat kidney MTAL. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F336-F347, 2003.

8-**Capasso JM, Rivard CJ, Berl T.** Long-term adaptation of renal cells to hypertonicity: role of MAP kinases and Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F768-F776, 2001.

9-**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* 288: C403-C415, 2005.

10-**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* 60:3160-4; 2000.

11-**Dahl SC, Handler JS, and Kwon HM.** Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C248-C253, 2001.

12-**Di Ciano C, Nie Z, Szaszi K, Lewis A, Uruno T, Zhan X, Rotstein OD, Mak A, Kapus A.** Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C850-C865, 2002.

13-**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* 285: F266-F274, 2003.

14-**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* 99: 184-189, 2002.

15-**Dmitrieva NI, Cai Q, Burg MB.** Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2317-2322, 2004.

16-**Dmitrieva NI; Ferraris Jd; Norenburg JL; Burg MB.** The saltiness of the sea breaks DNA in marine invertebrates: possible implications for animal evolution. *Cell Cycle*; 5(12): 1320-3, jun 2006.

17-**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*; 30(10): 1196-9, Oct 2006.

18- **Felippe JJ** . Em Busca do Mecanismo de Ação Único para o Tratamento das Doenças: Energia Livre - ATP. Um ensaio teórico com evidências experimentais. Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar, www.medicinacomplementar.com.br . Biblioteca de Câncer. Janeiro. Tema do mês de maio de 2003.

19-**Felippe JJr.** Tratamento do Câncer com medidas e drogas que inibem o fator nuclear NF-kappaB. Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar. www.medicinacomplementar.com.br. Tema do mês de fevereiro de 2004.

20- **Felippe JJr.** Fluidez da Membrana: possivelmente o ponto mais fraco das células malignas. Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar. www.medicinacomplementar.com.br. Tema do mês de maio de 2004.

- 21-**Felippe, J.Jr.** Câncer: população rebelde de células esperando por compaixão e reabilitação. Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar . www.medicinacomplementar.com.br . Biblioteca de Câncer. Tema da semana de 16/05/05.
- 22- **Felippe J.Jr.** Câncer e Inibidores do STAT 3 : Curcumina , Partenolide e Resveratrol. Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar, www.medicinacomplementar.com.br . Biblioteca de Câncer. Tema da semana de 01/05/06.
- 23-**Felippe J.Jr.** Câncer e Inibidores da SAP/MAPK(JNK/MAPK, ERK/MAPK, p38/MAPK): Resveratrol,tangeritina e ligustilide Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar, www.medicinacomplementar.com.br . Biblioteca de Câncer. Tema do mês de abril de 2006.
- 24-**Felippe, J.Jr.** Inflamação Crônica Subclínica - Peste Bubônica do Século XXI - Mecanismo Intermediário da Maioria das Moléstias que Afligem a Humanidade. Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar . www.medicinacomplementar.com.br . Biblioteca de Câncer. Tema da semana de junho de 2006.
- 25-**Felippe J.Jr.** Epigallocatequina-galato, ácido ascórbico, prolina, magnésio, cálcio, selênio, cobre e manganês são fortes estruturadores da água intracelular e provocam a inibição da proliferação, da invasividade e das metástases do câncer de pulmão, próstata, mama, pâncreas, bexiga, cérebro, testículo, mesotelioma, melanoma e fibrosarcoma. Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar. www.medicinacomplementar.com.br, junho de 2007 .
- 26-**Felippe J.Jr.** Água: vida-saúde-doença-envelhecimento-câncer:Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar. www.medicinacomplementar.com.br. Tema do mês de fevereiro de 2008.
- 27-**Felippe J.Jr.** Câncer e Tiosulfato de sódio : diminuição da proliferação celular do carcinoma epidermoide humano com um forte estruturador de clusters da água intracelular. Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar. www.medicinacomplementar.com.br , 22/03/2008.
- 28-**Felippe J.Jr.** Desvendando os Segredos do Câncer : Revista Eletrônica da Associação Brasileira de Medicina Complementar. www.medicinacomplementar.com.br. Tema do mês de maio de 2008.
- 29-**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* 91: 10742–10746, 1994.
- 30-**Ferraris JD, Williams CK, Ohtaka A, Garcia-Perez A.** Functional consensus for mammalian osmotic response elements. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C667–C673, 1999.
- 31-**Ferraris JD, Williams CK, Persaud P, Zhang Z, Chen Y, Burg MB.** Activity of the TonEBP/OREBP transactivation domain varies directly with extracellular NaCl concentration. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 739–744, 2002.
- 32-**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* 99: 16800–16805, 2002.
- 33-**Galvez A, Morales MP, Eltit JM, Ocaranza P, Carrasco L, Campos X, Sapag-Hagar M, az-Araya G, Lavandero S.** A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. *Cell Tissue Res* 304: 279–285, 2001.
- 34-**Hasler U, Vinciguerra M, Vandewalle A, Martin PY, Feraille E.** Dual effects of hypertonicity on aquaporin-2 expression in cultured renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol* 16: 1571–1582, 2005.
- 35-**Ito T, Fujio Y, Hirata M, Takatani T, Matsuda T, Muraoka S, Takahashi K, Azuma J.** Expression of taurine transporter is regulated through the TonE (tonicity-responsive element)/TonEBP (TonE-binding protein) pathway and contributes to cytoprotection in HepG2 cells. *Biochem J* 382: 177–182, 2004.
- 36-**Irrarrazabal 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* 101: 8809–8814, 2004.
- 37-**Jackson PS; Madsen JR.** Identification of the volume-sensitive organic osmolyte/anion channel in human glial cells. *Pediatr Neurosurg*;27(6):286-91; dec 1997.
- 38-**Jin Z, El-Deiry WS.** Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4: 139–163, 2005.
- 39-**Kim RG.** Hypoosmotic stress stimulates growth in HepG2 cells via protein kinase B dependent activation of activator protein-1. *J Gastrointest Surg*; 5(5):546-55,2001.
- 40-**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* 277: 46085–46092, 2002.
- 41-**Ko BC, Turck CW, Lee KW, Yang Y, Chung SS.** Purification, identification, characterization of an osmotic response element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 52–61, 2000.
- 42-**Ko BCB, Ruepp B, Bohren KM, Gabbay KH, Chung SS.** Identification and characterization of multiple osmotic response sequences in the human aldose reductase gene. *J Biol Chem* 272: 16431–16437, 1997.
- 43-**Kultz D, Chakravarty D.** Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 1999–2004, 2001.
- 44-**Laboisse 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* 48:2498-504; 1988.
- 45-**Lornejad- Schafer M.** Osmotic regulation of STAT3 stability in H4IIE rat hepatoma. *FEBBS Lett.* 579(25) 5791-7, 2005.
- 46-**Michalke M, Cariers A, Schliess F, Häussinger D.** Hypoosmolarity influences the activity of transcription factor NF-kappaB in rat H4IIE hepatoma cells. *FEBBS Lett.*, 7;465(1):64-8, 2000.
- 47-**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* 282: F981–F990, 2002.
- 48-**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* 278: F209–F218, 2000.

- 49-**Nadkarni V, Gabbay KH, Bohren KM, Sheikh-Hamad D.** Osmotic response element enhancer activity. Regulation through p38 kinase and mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase kinase. *J Biol Chem* 274: 20185–20190, 1999.
- 50-**Nakanishi T, Uyama O, Sugita M.** Osmotically regulated taurine content in rat renal inner medulla. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 261: F957–F962, 1991.
- 51-**Nakayama Y, Peng T, Sands JM, Bagnasco SM.** The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem* 275: 38275–38280, 2000.
- 52-**Parnaud G; Corpet DE; Gamet-Payrastre L.** Cytostatic effect of polyethylene glycol on human colonic adenocarcinoma cells. *Int J Cancer*; 92(1): 63-9, Apr 1 2001.
- 53-**Parnaud G; Taché S; Peiffer G; Corpet DE.** Pluronic F68 block polymer, a very potent suppressor of carcinogenesis in the colon of rats and mice. *Br J Cancer*; 84(1):90-3, Jan 5 2001.
- 54-**Rim JS, Tanawattanacharoen S, Takenaka M, Handler JS, Kwon HM.** The canine sodium/*myo*-inositol cotransporter gene: structural organization and characterization of the promoter. *Arch Biochem Biophys* 341: 193–199, 1997.
- 55-**Robbins E, Pederson T, Klein P.** Comparison of mitotic phenomena and effects induced by hypertonic solutions in HeLa cells. *J Cell Biol* 44: 400–416, 1970.
- 56-**Santos BC, Chevaile A, Hebert MJ, Zagajski J, Gullans SR.** A combination of NaCl and urea enhances survival of IMCD cells to hyperosmolality. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F1167–F1173, 1998.
- 57-**Santos BC, Chevaile A, Kojima R, Gullans SR.** Characterization of the Hsp110/SSE gene family response to hyperosmolality and other stresses. *Am J Physiol Renal Physiol* 274: F1054–F1061, 1998.
- 58-**Santos BC, Pullman JM, Chevaile A, Welch WJ, Gullans SR.** Chronic hyperosmolality mediates constitutive expression of molecular chaperones and resistance to injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F564–F574, 2003.
- 59-**Silvotti L, Petronini PG and Borghetti AF.** Differential adaptative response to hyperosmolality of 3T3 and transformed SV3T3 cells. *Exp Cell Res*; 193(2):253-61,1991.
- 60-**Sheikh-Hamad D, Di Mari J, Suki WN, Safirstein R, Watts BA III, Rouse D.** p38 kinase activity is essential for osmotic induction of mRNAs for HSP70 and transporter for organic solute betaine in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 273: 1832–1837, 1998.
- 61-**Street TO, Bolen DW, Rose GD.** A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13997–14002, 2006.
- 62-**Shuai, K., G.R. Stark, I.M. Kerr, Darnell J.** A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 261: 1744-1746; 1993.
- 63-**Taché S; Parnaud G; Van Beek E; Corpet DE.** Polyethylene glycol, unique among laxatives, suppresses aberrant crypt foci, by elimination of cells. *Scand J Gastroenterol*; 41(6): 730-6, Jun 2006.
- 64-**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* 5: 1104–1110, 2003.
- 65-**Wehenr F , Lawonn P , Tinel H.** Ionic mechanisms of regulatory volume increase (RVI) in the human hepatoma cell-line HepG2, *Plugers Arch*; 443(5-6):779-90,2002
- 66-**Woo SK, Lee SD, Na KY, Park WK, Kwon HM.** TonEBP/NFAT5 stimulates transcription of HSP70 in response to hypertonicity. *Mol Cell Biol* 22: 5753–5760, 2002.
- 67-**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.
- 68-**Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN.** Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214–1222, 1982.
- 69-**Yang T, Zhang A, Honeggar M, Kohan DE, Mizel D, Sanders K, Hoidal JR, Briggs JP, Schnermann JB.** Hypertonic induction of COX-2 in collecting duct cells by reactive oxygen species of mitochondrial origin. *J Biol Chem* 280: 34966–34973, 2005.
- 70-**Zhang Z, Dmitrieva NI, Park JH, Levine RL, Burg MB.** High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9491–9496, 2004.
- 71-**Zhang Z, Ferraris J, Irrazabal 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* 289: F506–F511, 2005.
- 72-**Zhang Z, Yang XY, Cohen DM.** Urea-associated oxidative stress and Gadd153/CHOP induction. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F786–F793, 1999.
- 73-**Zhong, Z., Z. Wen & J.E. Darnell.** Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science* 264: 95-98; 1994.
- 74-**Zhou X, Ferraris JD, Cai Q, Agarwal A, Burg MB.** Increased reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F377–F385, 2005.
- 75-**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*; 290(5):F1169-76,2006.

76-Zhou X, Ferraris JD, Dmitrieva NI, Liu Y, Burg MB. MKP-1 inhibits high NaCl induced activation of p38 but does not inhibit the activation of tonBP/OREBP: apposite roles of p38 delta. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 105(14):5620-5,2008.

77-Zou AP, Li N, Cowley AW Jr. Production and actions of superoxide in the renal medulla. *Hypertension* 37: 547-553, 2001.