



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL PAPEL DE SRC EN LA REGULACIÓN
DEL VOLUMEN: TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES
Y FLUJO DE OSMOLTOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
SILVIA CRUZ RANGEL



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR: DRA. HERMINIA PASANTES ORDOÑEZ

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Cruz Rangel Silvia 53 92 99 52 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 09832386-1</p>
<p>2. Datos del tutor Dra Herminia Pasantes Ordoñez</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr Julio Eduardo Roque Morán Andrade</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr Gerardo Ramos Mandujano</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 M en IBB Alette Ortega Gómez</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M en C Alejandro Ruiz Martínez</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. El papel de Src en la regulación del volumen: transducción de señales y flujo de osmolitos 50 p 2008</p>

A la UNAM,
Por mi formación y la de otros tantos

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Herminia Pasantes del Departamento de Biofísica, Instituto de Fisiología Celular UNAM. Agradezco el apoyo del Dr. Gerardo Ramos Mandujano. El presente trabajo fue apoyado por los proyectos CONACYT No. 46465 y DGAPA-PAPIIT No. IN209507.

Quiero expresar mi agradecimiento

A la Dra. Herminia Pasantes por todo su apoyo e inigualable guía académica.

A la Dra. Ruth Lezama por haber compartido sus conocimientos como una gran amiga.

Al Dr. Gerardo Ramos por su participación en la tesis, su minuciosa revisión y su paciencia.

A la M. en I.B.B. Alette Ortega, el Dr. Julio Morán y el M. en C. Alejandro Ruiz por su generosa atención y sus observaciones.

A mi familia por su apoyo y amor desmedido

A mis amigos y compañeros de laboratorio por su constante cercanía y calidez.

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	
Regulación del volumen celular: Mecanismos e importancia	3
Decremento Regulador de Volumen (DRV)	4
Incremento Regulador de Volumen (IRV)	5
Movilización de osmolitos durante el DRV	6
Transducción de Señales Osmóticas	8
Cinasas de tirosina y flujo de osmolitos	9
Familia de Src cinasas (SC): Estructura y regulación	12
Papel de las SC en la regulación de Volumen	14
Células SFY	17
OBJETIVO	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Cultivo celular	
Soluciones y Fármacos	
Inmunofluorescencias y microscopía confocal	
Inmunoanálisis por Western blot	
Experimentos de liberación de ³ H-Taurina	
Estimación de cambios en el volumen celular	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN	38
REFERENCIAS	39

ABREVIATURAS

ADH	Hormona antidiurética
BSA	Albúmina sérica bovina
DDFK	1,9-dideoxiforskolina
DIDS	Ácido 4-4'-diisotiocianoestilben-2,2'-disulfónico
DRV	Decremento regulador del volumen
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EGFR	Receptor al factor de crecimiento epidermal
EGTA	Ácido tetra-acético etilenglicol
ERK	Cinasa reguladas por señales extracelulares
FAK	Cinasa de focos de adhesión
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GABA	Ácido gama-amino butírico
LHT	Liberación hiposmótica de taurina
IRV	Incremento regulador del volumen
KCC	Cotransportadores K-Cl
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
NPPB	Ácido N-fenilantalanínico
PBS	Amortiguador de sales de fosfato
PI3K	Fosfatidil-inositol-3 cinasa
PP2	4-amino-5-(4-chlorophenil)-7-(t-butyl)pyrazol[3,4-d] pyrimidine)
RAPG	Receptores acoplados a proteínas G
RTK	Receptores con actividad cinasa de tirosinas
SC	Cinasas de la familia de Src
SDS-PAGE	Electroforésis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato
SYF	Células deficientes de Src, Fyn y Yes
TBS	Amortiguador salino Tris
TRP	Receptores a potenciales transientes
TKs	Cinasas de tirosina
VSOAC	Canal aniónico de osmolitos orgánicos activado por volumen

RESUMEN

Ante un cambio en la osmolaridad del medio externo las células presentan una respuesta adaptativa que le permite recuperar su volumen inicial, esta respuesta se lleva a cabo a través de una cascada de señalización que involucra la activación o fosforilación de proteínas cinasas. La fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), Src cinasa, cinasa de focos de adhesión (FAK), MAP cinasas, así como receptores con actividad de cinasa de tirosina EGFR y ERBb4, son algunos ejemplos de cinasas que aumentan su fosforilación por hiposmolariad (Lezama *et al.*, 2005; Pasantes-Morales y Franco 2002). Sin embargo su interrelación y jerarquía aun no están bien definidas.

El enfoque de esta tesis consiste en destacar la importancia de las cinasas de tirosina de la familia de Src en el proceso de transducción de señales osmóticas durante la recuperación volumen; mediante ensayos llevados acabo en una línea celular de fibroblastos deficientes en la expresión funcional de *src*, *Yes* y *Fyn* (células SYF), tres de los miembros más comunes y ampliamente expresados de la familia de Src.

Los resultados obtenidos muestran una posición de *src* jerárquicamente superior en la cascada de señalización durante el decremento regulador de volumen (DRV), así como su papel fundamental como proteína cross-talk, además de la marcada influencia sobre la vía de movilización de taurina.

EL PAPEL DE SRC EN LA REGULACIÓN DEL VOLUMEN: TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES Y FLUJO DE OSMOLITOS

INTRODUCCIÓN

Regulación del volumen celular: Mecanismos e importancia

Las membranas celulares son relativamente permeables al agua y a pequeñas moléculas sin carga, pero presentan un alto grado de impermeabilidad para la mayor parte de macromoléculas o iones. Cuando las concentraciones de estas partículas cambian a uno u otro lado de la membrana las fuerzas osmóticas producen la movilización de agua en la dirección que tienda a igualar la presión osmótica a ambos lados de la membrana; a dicho fenómeno se le conoce como “osmosis”. Si la célula se encuentra inmersa en una solución hiposmótica, es decir, una solución con una baja concentración de solutos, se produce un flujo neto de agua hacia el interior de la célula, dando como resultado el hinchamiento. Por el contrario, si la célula está rodeada de una solución con alta concentración de solutos, o hipertónica, la célula se encogerá debido a la salida de agua.

El mantenimiento de un volumen constante es una de las funciones homeostáticas más relevantes dentro de las células animales, ya que cualquier desequilibrio en la concentración de agua puede producir alteraciones no sólo en el volumen, sino también en la citoestructura, en las vías de señalización y la comunicación celular (O'Neill, 1999); por ejemplo, las células sometidas a condiciones anisotónicas, pueden cambiar las concentraciones de segundos mensajeros como el Ca^{2+} o el AMP-cíclico generando alteraciones a diferentes niveles.

Las células animales se encuentran rodeadas por fluidos cuya osmolaridad se mantiene aproximadamente en 280 mOsm/L mostrando variaciones dentro de un rango muy pequeño que no excede de un 3% (Hoffmann y Simonsen, 1989). Sin embargo, a nivel celular, se generan microgradientes osmóticos como resultado de procesos fisiológicos entre los que destacan: secreción, migración, crecimiento, proliferación y síntesis o degradación de macromoléculas, entre muchos otros procesos celulares (Pasantés-Morales *et*

al., 2000). Esta modificación en las concentraciones de solutos propicia cambios en el volumen de la célula, los cuales son compensados a través de mecanismos de regulación que van desde la movilización de osmolitos orgánicos e inorgánicos, hasta la modificación de vías metabólicas (Lang *et al.*, 1998). Los procesos encaminados a la corrección en las desviaciones del volumen celular se definen como Incremento Regulador de Volumen (IRV) y Decremento Regulador de Volumen (DRV), y ocurren mediante la activación de efectores que regulan el flujo de los osmolitos y de agua (O'Neill, 1999), los cuales pueden tener características difusionales o bien, implicar un gasto energético.

En situaciones patológicas es común que el volumen celular se vea particularmente comprometido, por ejemplo durante la hiponatremia, situación en la que se presenta una pérdida del balance entre la ingesta y excreción de agua y de electrolitos lo cual deriva en un déficit de sodio y un exceso de agua; o bien de manera más común se observan modificaciones en la osmolaridad del medio en fallas renales como consecuencia de secreción inapropiada de hormona antidiurética (ADH), deficiencia de glucocorticoides, hipotiroidismo e insuficiencia hepática. En otros casos como trauma craneoencefálico, encefalopatía hepática o isquemia, el aumento del volumen celular se presenta debido a alteraciones a nivel de los mecanismos de movilización de los osmolitos sin que se modifiquen las condiciones de osmolaridad externa (Pasantés-Morales *et al.*, 2002). De no ser corregidas estas alteraciones en el volumen, podría haber consecuencias graves para el individuo.

En esta investigación nos enfocamos a trabajar con los fenómenos particulares de del hinchamiento celular producido por una disminución en la concentración de osmolitos del medio extracelular.

Decremento Regulador de Volumen (DRV)

Cuando las células son expuestas a un medio hiposmótico se produce la entrada de agua e incremento en el volumen celular. El volumen máximo alcanzado va a depender de diversos factores, como son: a) que tan rápido se presenta el cambio en la osmolaridad del medio extracelular, b) la

permeabilidad de la membrana plasmática con respecto al agua y c) la relación que existe entre el área de la membrana y el volumen de la célula (Hallows y Knauf, 1994; Lang *et al.*, 1998; Hoffmann y Simonsen, 1989). El aumento en el volumen activa una respuesta encaminada a recuperar el volumen inicial de la célula, aun cuando siga sometida a una condición hiposmótica (Lang *et al.*, 1998; Pasantes-Morales *et al.*, 2000; Niemeyer *et al.*, 2001; Furst *et al.*, 2002). Este proceso, encaminado a contrarrestar los efectos inducidos por hinchamiento es conocido como Decremento Regulador de Volumen (DRV) y se lleva a cabo mediante la activación de mecanismos tendientes a disminuir la concentración celular de los solutos osmóticamente activos (Sánchez-Olea y Pasantes-Morales, 1993). El DRV presenta una fase rápida caracterizada por la salida transmembranal de solutos orgánicos e inorgánicos con actividad osmótica, y una fase de respuesta lenta que consiste en regular la síntesis de transportadores de iones y osmolitos orgánicos así como de enzimas que son requeridas para que estos sean sintetizados (Cohen, 2005). En la mayoría de los casos las células no recuperan su volumen original, sino que alcanzan uno ligeramente superior a aquel que tenían inicialmente (Pasantes-Morales *et al.*, 1993); el tiempo requerido para alcanzar este volumen varía según el tipo celular y puede ser de un lapso de entre 15 a 30 minutos posteriores al estímulo hiposmótico o bien, de varias horas (Pasantes-Morales *et al.*, 1996). En el DRV se pueden distinguir tres etapas: 1) la célula detecta modificaciones en su volumen mediante un “sensor de cambio en volumen” cuya identidad aun no ha sido esclarecida, aunque se ha propuesto que podría tratarse de alguna molécula del tipo de las integrinas, algún receptor con actividad intrínseca de cinasa de tirosina como los receptores a factores de crecimiento o bien receptores TRPC (Pasantes-Morales *et al.*, 2006), 2) se activan cascadas de señalización que permiten amplificar la señal enviada por el sensor y por último 3) se ponen en marcha las vías de movilización de osmolitos, seguido del silenciamiento o inactivación de los mecanismos de regulación mediante un componente celular que actúa como “memoria” del volumen original (Pasantes-Morales *et al.*, 1993) (Fig. A).

Incremento Regulador de Volumen (IRV)

Cuando las células se encuentran en condiciones de hiperosmolaridad, los mecanismos activados para recuperar el volumen inicial están encaminados a

la acumulación de osmolitos y agua hacia el interior celular. Este proceso es denominado Incremento Regulator de Volumen, IRV (Okada *et al.*, 2001; Sánchez Olea y Pasantes-Morales 1993). Los mecanismos involucrados son los intercambiadores Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y la ATPasa Na^+/K^+ , así como el sistema de cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (Lang *et al.*, 1998). En algunos tipos celulares estas respuestas están acompañadas de la activación de canales de Na^+ o canales catiónicos no selectivos (Alfieri y Petronini, 2007).

Cabe destacar que el presente estudio se enfoca en algunos aspectos de la osmotransducción en el DRV sin hacer ninguna referencia al IRV.

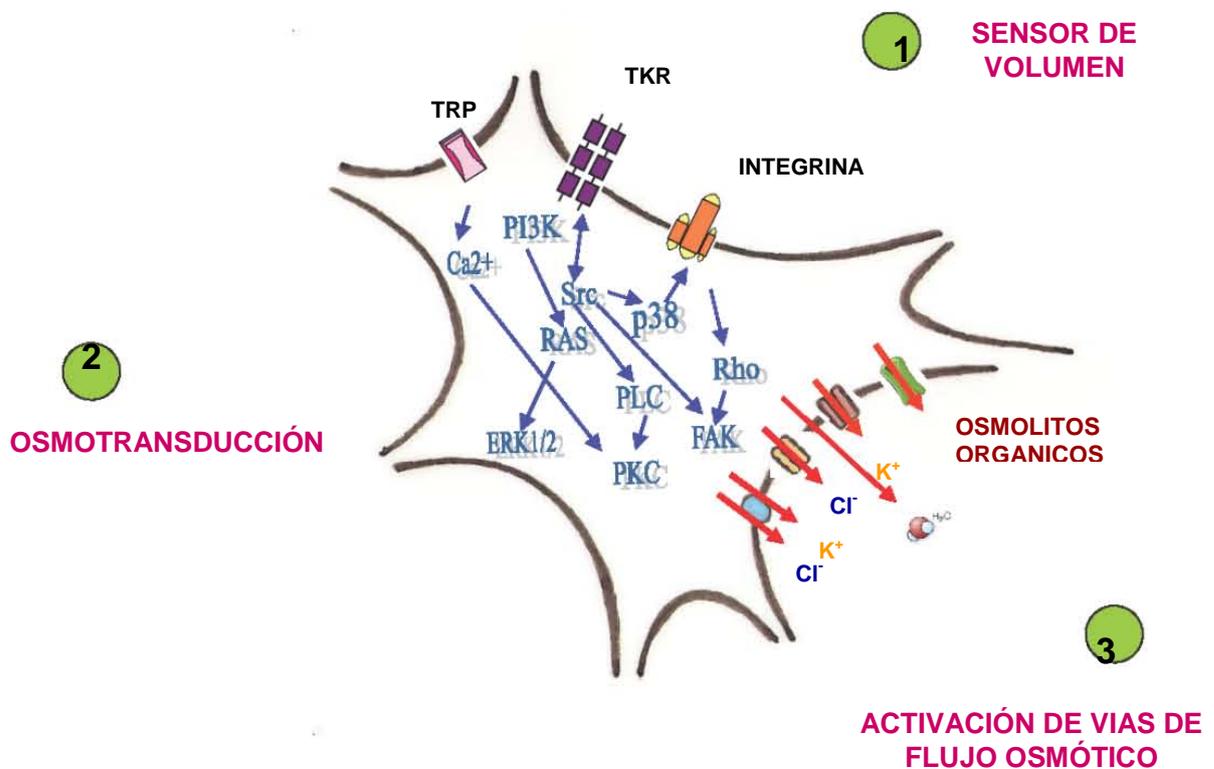


Figura A **Etapas implicadas en el proceso de la recuperación del volumen celular después del hinchamiento hiposmótico.** La célula mediante el mecanismo DRV activa vías de movilización de osmolitos que le permiten reestablecer las presiones osmóticas y por lo tanto recuperar su volumen inicial.

Movilización de osmolitos durante el DRV

El mecanismo de recuperación del volumen celular implica modificaciones en la concentración de solutos con actividad osmótica mediante su movimiento en la dirección que sea necesaria para contrarrestar la ganancia o pérdida neta de agua.

Dichos osmolitos se encuentran en diferentes concentraciones dependiendo del tipo celular y se agrupan dentro de dos grandes categorías: los iones inorgánicos como K^+ , Na^+ y Cl^- , quienes contribuyen en un 60 a 70% al DRV debido a sus altas concentraciones en el interior de la célula (Grinstein *et al.*, 1982; Pasantes-Morales *et al.*, 1996), y los osmolitos orgánicos integrados por pequeñas moléculas incluyendo aminoácidos como glicina, alanina, glutamato y taurina; polialcoholes entre los que destacan el mioinositol y el sorbitol; y otros compuestos como creatinina, fosfocreatinina, fosfoetanolamina, glicerofosforilcolina y N-acetil-aspartato (Balaban y Burg, 1987; Smith y Pierce, 1987).

En relación con el movimiento de osmolitos orgánicos durante el DRV es de especial interés el caso de los aminoácidos, y entre estos en particular la taurina. Las características de esta molécula la hacen excelente para su función como osmolito (Pasantes-Morales *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1997). La taurina es un β -aminoácido sulfónico que resulta del metabolismo de la cisteína (Wright *et al.*, 1886). En condiciones fisiológicas se encuentra libre en el espacio citosólico en forma de zwitterión, es decir, se comporta como una molécula eléctricamente neutra, en la mayoría de las células las concentraciones son cercanas a 1-2 mM, pero en algunos órganos como cerebro, músculo, corazón y retina alcanza concentraciones especialmente altas del orden de 10-40 mM (Jacobsen y Smith, 1968; Huxtable, 1992). Debido a su relativa inercia metabólica, así como al hecho de que no forma parte en la estructura de las proteínas, puede moverse libremente hacia dentro o fuera de la célula con función osmótica, sin producir alteraciones en el metabolismo celular.

En la mayor parte de las células la poza intracelular de taurina se moviliza en respuesta a un incremento en el volumen generado por un medio hiposmótico

(Lambert *et al.*, 2004; Ordaz *et al.*, 2004, Pasantes-Morales *et al.*, 2002). La salida de taurina inducida por hinchamiento bajo condiciones hiposmóticas se lleva a cabo mediante una vía difusional, en la que el flujo ocurre en la dirección impuesta por el gradiente electroquímico de forma independiente de energía y se ve incrementado conforme la osmolaridad del medio resulta mas baja (Sánchez-Olea *et al.*, 1991). Dentro del perfil farmacológico de la movilización de la taurina destaca que su transporte es inhibido por bloqueadores generales de canales de Cl⁻, como son: DIDS, NPPB, DDF, ácidos grasos poli-insaturados y ácido niflúmico (Pasantes-Morales *et al.*, 1994; Sánchez-Olea *et al.*, 1993), lo cual puede estar indicando que la taurina es transportada a través de un canal aniónico que permite el paso de zwitteriones, o bien, que la concentración de Cl⁻ intracelular pudiera estar modulando esta vía de liberación, de modo que si se inhibe la disminución de Cl⁻, se impide también el flujo de osmolitos orgánicos (Pasantes-Morales *et al.*, 2006).

Además de la taurina, otros aminoácidos también son osmóticamente activos; entre ellos se encuentra el GABA y el glutamato. Dado que estos aminoácidos funcionan como neurotransmisores, su movilización hacia el exterior de la célula para la regulación de volumen representa un riesgo a la excitabilidad neuronal comprometiendo la red de señalización entre las neuronas y desencadenando fenómenos de excitotoxicidad (Pasantes-Morales *et al.*, 2002).

Transducción de Señales Osmóticas

No fue sino hasta hace algunos años que los estudios acerca de regulación de volumen frente a un estímulo hiposmótico se enfocaron en la identificación de señales que conducen la información del cambio en el volumen hacia las vías de movilización de los osmolitos. A pesar de que es un tema aún con muchos aspectos por esclarecer, se reconocen claramente dos respuestas celulares ante el estímulo hiposmótico: a) la activación de proteínas con actividad de cinasa: Cinasas de tirosina (TKs), cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y cinasas de fosfoinositidos (PI3K), y b) el incremento en los niveles de calcio intracelular [Ca²⁺]_i (McCarty y O'Neil, 1992).

Las TKs y las MAPKs, son proteínas reconocidas por estar implicadas en numerosas funciones celulares que van desde motilidad celular hasta respuestas tan complejas como la diferenciación, supervivencia y migración celular (Pasantes-Morales *et al.*, 2006). A pesar de los numerosos estudios acerca del papel de estas proteínas sobre vías de señalización, solo unas cuantas investigaciones se han enfocado al conocimiento de su papel dentro de las respuestas celulares adaptativas desencadenadas por el incremento en volumen (Tilly *et al.*, 1993). Algunas de las proteínas (citoplasmáticas o transmembranales) fosforiladas como respuesta a una disminución en la osmolaridad del medio extracelular incluyen a la cinasa de adhesión focal p125FAK, las MAP cinasas p38 y ERK1/2, la cinasa de fosfoinosítidos PI3K, las cinasas de tirosina de la familia de Src, así como miembros de la familia de los receptores a factores de crecimiento (Tilly *et al.*, 1993, Lezama *et al.*, 2005). Muchas de estas señales están implicadas en respuestas requeridas para el ajuste del volumen desencadenando respuestas como: cambios en la adhesión celular a la matriz extracelular, reorganización del citoesqueleto por efecto del hinchamiento, reacomodo de los elementos de membrana, activación de respuestas de supervivencia ante el estrés generado aunque no necesariamente en la activación del flujo de osmolitos. Sin embargo, a pesar de que su activación durante el DRV se ha identificado claramente en diversos tipos celulares, su interacción y participación durante el proceso aún no se conoce con certeza.

Cinasas de tirosina (TKs) y flujo de osmolitos

Las vías mediante las cuales se lleva a cabo la movilización de los osmolitos orgánicos e inorgánicos han sido descritas de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y su perfil farmacológico. El flujo de iones Cl^- y K^+ activado por hinchamiento celular se lleva a cabo mediante canales separados para aniones o cationes.

En diferentes tipos celulares se ha identificado la participación de los canales de Cl^- activados por volumen (Cl^-_{vol}), y con características muy semejantes en los distintos tipos celulares (Fürst *et al.*, 2002), lo cual indica que seguramente solo este tipo de canal de Cl^- participa durante el DRV. La corriente de Cl^- es típicamente de rectificación saliente, con una conductancia

intermedia entre 40-78 pS, se inactiva a potenciales mayores de +60 mV, presenta selectividad aniónica sobre los cationes y una amplia permeabilidad a los aniones incluyendo aquellos de gran tamaño como benzoato y gluconato; para su activación se requiere la presencia de ATP aunque no su hidrólisis, la corriente se inhibe por bloqueadores generales de canales de Cl⁻, como son: ácido araquidónico, DIDS (ácido disulfónico 4,48-diisithiocinato-stilbeno-2-28), NPPB (5-Nitro-[3-fenilpropilamino]) y DDF (dideoxiforskolin) (Okada, 1997). El papel de las TKs en la modulación de las corrientes de Cl⁻ activadas por volumen no está aún completamente definida; en varios tipos celulares parecen estar regulando su funcionamiento, ya que se inhiben por bloqueadores generales de TK de tipo citosólico (genisteína) o específicos para receptores tipo tirosina cinasa (trifostinas), mientras que la inhibición de fosfatasas de tirosina, promueve su incremento. (Shi *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2001; Shuba *et al.*, 2000; Voets *et al.*, 1998; Abdullaev *et al.*, 2003; Bryan-Sisneros *et al.*, 2000; Crepel *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2003; Sorota *et al.*, 1995). Sin embargo en otros estudios realizados en células cardíacas tienen efectos opuestos, ya que la genisteína promueve el incremento de las corrientes de cloro activadas por volumen mientras que el O-vanadato y las trifostinas las inhiben (Du *et al.*, 2004; Walsh y Zhang 2005), lo cual estaría reflejando un efecto distinto de las tirosinas cinasas citosólicas y las de tipo receptor.

Contrario a las similitudes en las propiedades de la ICl_{vol} que se observan en diferentes tipos celulares, se sabe que son varios los tipos de canales de K⁺ que están involucrados en la regulación del volumen. Se ha observado que los canales de K⁺ presentes en las células pueden ser activados por algunas de las señales producidas por el hinchamiento celular, como por ejemplo, la despolarización o el incremento en los niveles de calcio (Pasantés-Morales y Morales-Mulia, 2000). Estos estímulos pueden activar canales de K⁺ sensibles a voltaje o a los activados por Ca²⁺ de conductancia grande, mediana o pequeña. Los canales de dos poros también responden al hinchamiento en algunas células, así como los canales sensibles a estiramiento. Hay algunos reportes sobre un canal de K⁺ que sería activado exclusivamente por hinchamiento y que se caracteriza por ser refractario a los inhibidores clásicos de canales de K⁺ pero que se inhibe por clofilio, gadolinio y quinidina; este canal pertenece al subtipo TASK-2 de la familia de canales de dos poros (Niemeyer *et al.*, 2001).

En cuanto al efecto de las TK en diferentes tipos de canales de K^+ activados por cambios en el voltaje (K_v) se ha visto una influencia directa de un complejo que implica a las cinasas de la familia de Src y otras no TK (Fadool y Levitan, 1998; Mason *et al.*, 2002); aun así, no se ha estudiado a detalle la interacción TK-canal K_v durante la regulación de volumen. En otros tipos celulares, donde la hiposmolaridad implica un incremento de los niveles de calcio intracelular, el perfil farmacológico sugiere la participación de los canales de K^+ dependientes de calcio (BK_{Ca}) modulada por la fosforilación de cinasas de tirosina tanto de tipo receptor, como aquellas de tipo citosólico, en particular las cinasas de tirosina de la familia Src. El papel de las TK sobre otras vías de movilización del K^+ durante la regulación de volumen como respuesta a un estímulo hiposmótico, como los canales de K^+ activados por hinchamiento (K^+_{vol}), activados mecánicamente por estiramiento o el acarreador electroneutro K^+/Cl^- aun no han sido estudiados a detalle.

Los flujos de taurina y glutamato incrementados por el aumento en volumen, también se ven regulados por la fosforilación de las cinasas de tirosina citosólicas y membranales. Utilizando inhibidores de receptores a factores de crecimiento (AG1478, AG112) o bloqueadores de la vía de MEK (PD98059) en rebanadas de hipocampo y en retina de pollo, así como en la línea celular de fibroblastos swiss 3T3, se distingue claramente una disminución en el flujo de taurina, mientras que la cinasa p38 tiene una participación distinta dependiendo del tipo celular (de la paz *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2001). Estudios detallados sobre miembros de la familia de Src en eritrocitos de raya vinculan de manera estrecha a estas cinasas con la liberación de taurina, mostrando que inhibidores generales de cinasas de tirosina bloquean el canal de osmolitos orgánicos sensible a volumen, mientras que por inhibición de la actividad de fosfatasas de tirosina el canal se mantiene activado (Musch y Goldstein, 2005).

Dentro de las cinasas de tirosina que se encargan de regular el proceso encaminado a la recuperación del volumen celular es de especial interés el caso de la cinasa de residuos de tirosina src. Hace ya varios años fue reconocida su habilidad de influir en el transporte iónico y recientemente se ha incrementado la evidencia que sugiere una amplia participación de los

miembros de la familia src en la respuesta celular a estrés hiposmótico y el consecuente DRV (Musch y Goldstein, 2005; Cohen, 2005).

Esta enzima es la primera proteína con la capacidad de fosforilar en residuos de tirosina que fue descubierta y cuya importancia radica en muchos procesos fisiológicos. Aunque inicialmente fue caracterizada en el contexto del crecimiento y diferenciación celular, actualmente se asocia a procesos como adhesión, motilidad, apoptosis y carcinogénesis (Brown y Cooper, 1996; Lowell y Soriano, 1996; Parsons y Parsons, 1997; Thomas y Brugge, 1997). Una vez activada, src estimula una serie de moléculas efectoras incluyendo MAP cinasas y proteínas de citoesqueleto que contribuyen a través de un complejo mecanismo a la regulación del volumen.

Este trabajo se enfocará en estudiar las implicaciones de esta cinasa durante el DRV en células de mamífero, siguiendo su activación, los blancos de interacción con las otras cinasas activadas por hiposmolaridad y por lo tanto los eventos que podría estar regulando.

Familia de Src cinasas (SC): Estructura y regulación.

Las SC son cinasas citosólicas de tipo no receptor derivadas del protooncogen c-Src. Se han identificados nueve miembros de esta familia, organizados en tres grandes grupos: las SC restringidas a linajes hematopoyéticos HCK, FGR, BLK y LCK ; la SC LYN presente tanto en tejido hematopoyético como en tejido neural y las SC, SRC, FYN y YES, que presentan una amplia distribución en tejidos animales (Brown y Cooper, 1996; Thomas y Brugge, 1997).

Los miembros de la SC son proteínas cuyo peso molecular se encuentra entre los 52-62 kDa y presentan una arquitectura modular caracterizada por la presencia de dominios SH con actividad de cinasa de tirosina (Fig.B).



Figura B **Estructura de la familia de Src cinasas.** Se muestran las seis distintas regiones funcionales: a) dominio SH4, b) una región única c) dominio SH3, d) dominio SH2, e) dominio catalítico y f) tallo corto de regulación negativa.

En su estado inactivo el residuo de tirosina Y416 en el dominio SH1 bloquea el sitio de unión al sustrato; cuando se autofosforila, el residuo se desplaza y permite el acceso al sustrato. Los dominios SH2 y SH3 son sitios de interacción proteína-proteína. Las SC se mantienen en estado inactivo mediante la fosforilación constitutiva del residuo Y527 en el COOH terminal, que se une al dominio SH2 haciendo inaccesible el dominio SH1. Cuando es removido el fosfato del residuo de tirosina en el COOH terminal por alguna fosfatasa de tirosina, el dominio catalítico es expuesto. Las interacciones con el dominio SH3 son menos dinámicas, uniéndose a secuencias ricas en prolina. Una vez que Src es activado, se mueve hasta la membrana celular donde mediante la miristilación o palmitolación del amino terminal se ancla a la parte interna de ella (Brown y Cooper, 1996) (Fig.C).

Las SC son activadas por varios estímulos, como son: receptores a factores de crecimiento, integrinas, receptores acoplados a proteínas G, entre otros. La fosforilación de las proteínas produce la modificación directa de sus funciones o el ensamble a complejos de señalización iniciando cascadas de transducción (Martin, 2001). En el caso de los receptores a factores de crecimiento, el ligando SH2 es un residuo de fosfotirosina en el receptor autofosforilado; en los receptores adrenérgicos por su parte (receptor acoplado a proteínas G), el ligando a SH3 es una α -helice de prolina unido al receptor mediante una interacción con β -arrestina; en el caso de las integrinas, el ligando es un residuo de tirosina fosforilado en la cinasa de adhesión focal (FAK) autofosforilada (Martin, 2001; Thomas y Brugge, 1997).

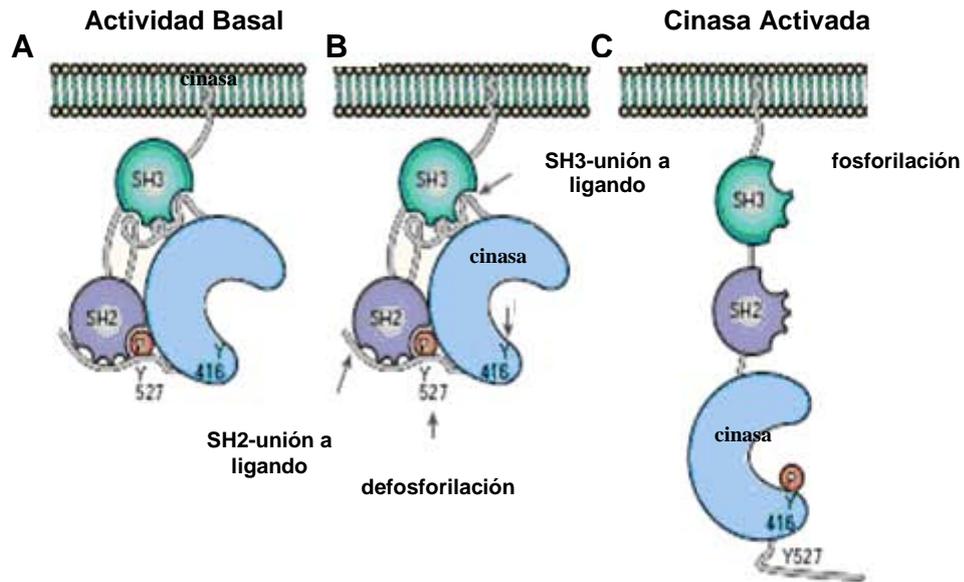


Figura C **Mecanismo de activación de Src.** (A) Src en su conformación inactiva, la Tyr 527 se encuentra interactuando con el dominio SH2, posicionando el dominio SH3 para su función como intermediario entre el dominio SH2 y el dominio catalítico. (B) Mecanismos de fosforilación y defosforilación implicados en la activación de src. (C) conformaron activa, src presenta el dominio catalítico expuesto. Adaptado de Martin, 2001.

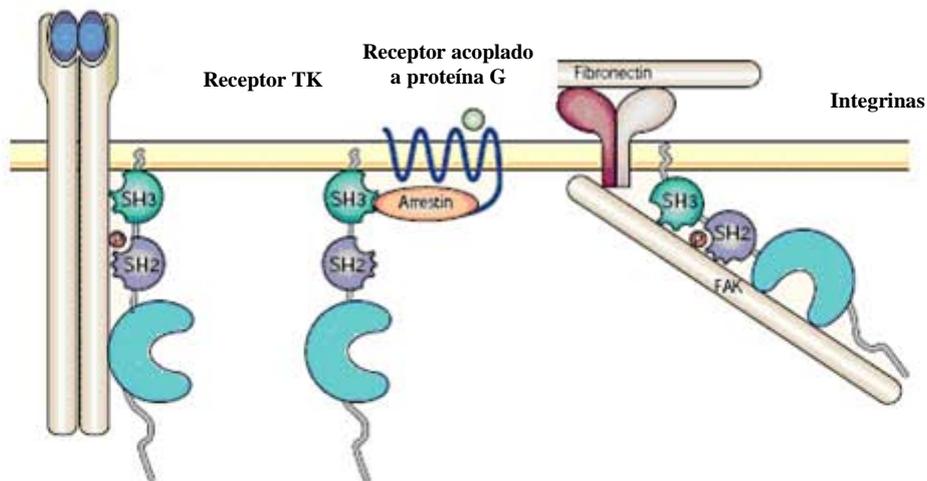


Figura D **Regulación de src por receptores de superficie.** Se muestra la activación de src de izquierda a derecha por un receptor con actividad de cinasa de tirosina, un receptor acoplado a proteína G y una proteína de unión a matriz extracelular (Martin, 2001).

Papel de las SC en la Regulación de Volumen

Los cambios en la osmolaridad del medio así como el estrés hiposmótico, activan diferentes miembros de SC en distintos tipos celulares: LYN (Koomoa *et al.*, 2001, Musch *et al.*, 1995, Xu *et al.*, 2003) LCK (Reinehr *et al.*, 2004; Lang *et al.*, 2000) y SRC (Vom Dahl *et al.*, 2003).

En cuanto a la influencia directa de las cinasas de tirosina citosólicas de la familia de src sobre los flujos iónicos correctores de volumen, se ha estudiado su papel sobre la fosforilación del canal Kv (Fadool y Levitan, 1998; Mason *et al.*, 2002). Las SC afectan a una variedad de estos canales incluyendo Kv1.3 (Bowlby *et al.*, 1997; Cook y Fadool, 2002; Fadool *et al.*, 1998; Gulbins *et al.*, 1997) Kv1.4 (Nitabach *et al.*, 2002) Kv1.5 (MacFarlane y Sontheimer, 2002; Nitabach *et al.*, 2001; Sobko *et al.*, 1998) Kv2 (Sobko *et al.*, 1998) y Kv7 (Gamper *et al.*, 2003); pero solo Kv1.3 y Kv1.5 se han distinguido por su papel dentro del DRV. En el que parece ser el ejemplo mejor estudiado de la regulación de src sobre el flujo de K⁺, el modelo del linfocito T Jurkat; SFK LCK parecen ser requeridas para la inhibición más que para la activación del canal Kv1.3 (Deutsch y Chen, 1993), lo cual resulta paradójico ya que LCK es generalmente activada por hinchamiento celular e incrementa la actividad de los canales de K⁺.

Por su parte, los canales de K⁺ de conductancia grande activados por calcio BK_{Ca} se ven influenciados por miembros de SC bajo condiciones hiposmóticas, en donde se alcanzan niveles de Ca²⁺ requeridos para su activación (Cohen, 2005). Los ensayos de coimmunoprecipitación detectan una relación directa de la activación del canal por efecto de las cinasas de la familia de src (Ling *et al.*, 2004). La influencia de Src sobre la actividad de los canales BK_{Ca} ha sido demostrada tanto en estudios de carácter farmacológico como molecular; en células HEK293 se muestra como src en presencia de Ca²⁺ podría estar fosforilando el residuo de Tyr1766 en el carboxilo terminal y formando la subunidad del canal BK_{Ca} (Alioua *et al.*, 2002). Otras funciones importantes de los miembros de la familia Src, en particular los asociados a integrinas han sido recientemente explorados. Mediante ensayos de coimmunoprecipitación se ha observado que Pyk2 y Hck pueden estar llevando a cabo la fosforilación directa del canal BK_{Ca} y ya que Pyk2 y Hck son componentes de la señalización

de integrinas. Estos resultados sugieren una vía de osmotransducción, integrina-Src. (Ling *et al.*, 2004).

Existen muy pocos estudios en los que se haya investigado la influencia de src en los canales aniónicos regulados por volumen implicados en RVD. En células ciliadas de hepatoma el uso del bloqueador de Src, PP2 inhibe la corriente de cloro activada por incremento en el volumen de la célula (ICl_{vol}); sin embargo en cardiomiocitos el efecto es contrario. En estudios realizados en linfocitos T Jurkat, se muestra que la cinasa LCK tiene un papel modulador del RVD mediante la activación de la ICl_{vol} , ya que en células deficientes de dicha cinasa la regulación del volumen así como las corrientes de ICl_{vol} se ven seriamente afectadas. Cuando LCK es retransfectada se restaura la activación de las corrientes osmóticas (Lepple-Wienhues *et al.*, 1998).

En cuanto a los flujos de solutos orgánicos asociados a DRV, también son potencialmente regulados por Src (Cohen, 2005). Las investigaciones más consistentes a este respecto se han realizado en eritrocitos de raya. En estas células se ha propuesto que la movilización de taurina se lleva a cabo mediante el intercambiador aniónico banda 3 que por efecto de la hiposmolaridad es translocado a la membrana interactuando con ankirina y banda 4.1. Los miembros de CS, SYK y LYN pueden estar teniendo un papel modulador del flujo de taurina activado por hinchamiento, estas cinsas fosforilan al intercambiador aniónico banda 3 y promueven en este caso, una inhibición en la liberación de taurina (Hubert *et al.*, 2000). Estudios del mismo grupo muestran que los miembros de la familia de Src no son requeridos para la oligomerización ni translocación del intercambiador, pero si para la interacción entre las proteínas (Musch y Goldstein, 2005).

Han sido pocas las investigaciones llevadas a cabo en otros tipos celulares, por ejemplo, en cultivos primarios de neuronas granulares de cerebelo y en la línea celular de fibroblastos Swiss 3T3, se ha visto que src se activa en respuesta a un estímulo hiposmótico (Vázquez-Juárez *et al.*, 2007; Lezama *et al.*, 2005). Más allá de su activación, se ha encontrado como intermediario dentro de la transactivación del receptor a EGF por RAPG, incrementando la liberación de taurina y acelerando la ICl_{vol} (Vázquez-Juárez *et al.*, 2007).

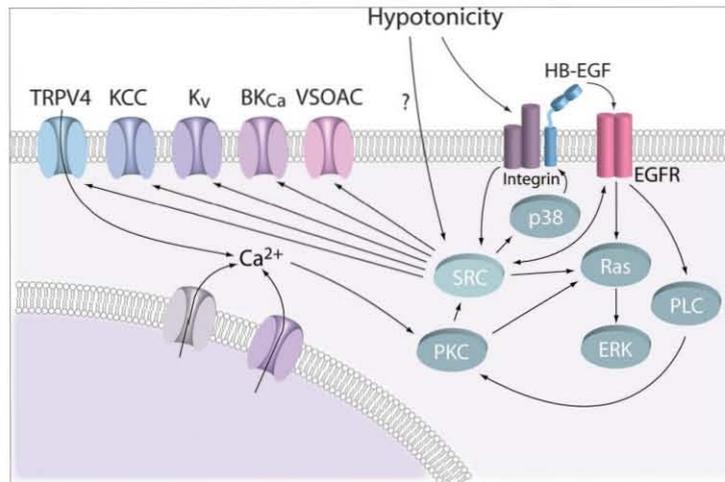


Figura E **Papel de src como proteína cross-talk** para una variedad de efectores de la regulación del volumen celular en eritrocitos de raya. Src podría estar implicado en la activación de canales e intercambiadores, como son: K_v canales de potasio activados por voltaje, KCC cotransportadores K^+-Cl^- , BK_{Ca} canales de potasio de conductancia grande activados por calcio, VSOAC canales anionicos de osmolitos orgánicos sensibles a volumen y el TRPV4 (Cohen DM, 2005).

Esta revisión sobre las investigaciones que relacionan a src con los mecanismos de DRV muestra por una parte, que dichos estudios son muy escasos y por otra, que se ha hecho sobre todo en eritrocitos por lo que el conocimiento de la influencia de las CS en otros tipos celulares esta aún por ver.

Células SFY

Como una herramienta para entender el papel fisiológico de src, se generó en 1997 la línea celular SYF, a partir de embriones de ratón con mutaciones funcionales en ambos alelos de los miembros de la familia de Src expresados con mayor frecuencia: Src, Yes y Fyn (SYF). Estas células fueron immortalizadas por infección con un vector retroviral transduciendo el antígeno T grande de SV40, con un gene de resistencia a neomicina para facilitar la selección.

Como control positivo generalmente se utilizan dos variantes de este tipo celular; las células src^{+/+} o las células SYF^{c-src}. Las células src^{+/+} son una

línea celular derivada de embriones de ratones control, estas expresan endógenamente la cinasa de tirosina src de tipo silvestre pero pierden la expresión de las cinasas Fyn y Yes. Las células SYF + c-src por su parte consisten en las células SYF antes descritas a las cuales les fue reintroducido c-Src dentro del triplete SYF de las células mutantes vía el vector retroviral pLXSH, además de que presentan también resistencia a hygromicina y neomicina (Klinghoffer, *et al.*, 1999).

Estas líneas celulares constituyen una herramienta interesante para conocer el papel de src en la regulación del volumen.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la proteína con actividad de cinasa de tirosina src en algunos de los procesos implicados en el mecanismo de regulación de volumen celular desencadenado por estrés hiposmótico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I.** Evaluar el papel de src en la activación de algunas de las cinasas que responden ante un estímulo hiposmótico.
- II.** Determinar la influencia de src en la vía a través de la cual permea la taurina en respuesta a hiposmolaridad
- III.** Investigar la influencia de Src en la respuesta de incremento del volumen celular ante una reducción en la osmolaridad del medio extracelular.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las líneas celulares de fibroblastos Src +/+ y SYF (American Type Culture Collection, Manassas, Va., USA) fueron sembradas en cajas petri de 100 mm a una densidad de 7×10^5 células/caja para los inmunoensayos de western blot, cajas de 35 mm a una densidad de 1.5×10^5 células por caja para flujos de taurina marcada radioactivamente y sobre cubreobjetos a 1×10^4 células por caja de densidad para preparaciones de inmunofluorescencia. Las células en todos los casos, fueron cultivados en medio DMEM conteniendo suero fetal bovino 10%, glutamina 2mM, penicilina 50U/ml y estreptomycin 50 μ g/ml; y usadas después de 2-3 días cuando las células fueron confluentes o subconfluentes en el caso de las inmunofluorescencias. Las cajas de cultivo fueron incubadas en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire a 37 °C.

Soluciones y Fármacos

Medio isosmótico: NaCl 135mM; KH₂PO₄ 1.17mM; KCl 4.7mM; CaCl₂ 1mM; glucosa 5mM; MgSO₄ 1.17mM; HEPES 10mM; ajustando el pH a 7.4, con una osmolaridad de 300 mOsm.

Medio hiposmótico: La solución hiposmótica 30% fue preparada mediante la reducción de la concentración de NaCl, con una osmolaridad de 210 mOsm.

La osmolaridad de los medios fue determinada con un osmómetro de punto de congelamiento (Osmette A, Precision Systems Inc, Natick, MA). Las células control fueron tratadas en paralelo con DMSO 0.1%, un vehículo usado para preparar la solución que contienen los fármacos probados.

Los reactivos utilizados un la preparación de los medios proceden de Merck (Darmstadt, Germany); [³H]-taurina de American Radiolabeled Chemicals (St. Louis Mo), Medio DMEM Invitrogen

Inmunofluorescencias y microscopía confocal

Las células fueron crecidas en cubreobjetos de vidrio en medio completo, después de 24 hr. de privación de suero fueron lavadas con medio isosmótico para después ser sometidas a las condiciones experimentales y fijadas con formaldehído 3.7% a temperatura ambiente por 20 min. Las células fueron permeabilizadas por 3 min mediante tratamiento con tritón X-100 0.5% y

luego bloqueadas con albúmina sérica bovina en PBS (PBS/BSA) 0.5% por 30 min, posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente a una dilución de 1:25 en PBS/BSA durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación las células fueron lavadas con PBS; el anticuerpo secundario goat anti-conejo IgG marcado con FITC fue adicionado por 60 min a temperatura ambiente (dilución 1:50 con PBS/BSA). Después de los lavados con PBS los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos con 50µl de medio de montaje fluorescente DAKO (Carpinteria CA) para la observación en microscopía laser confocal (BIORAD, CA). La intensidad de fluorescencia fue analizada usando el programa Image-pro Plus 5.0. Se analizaron cinco muestras conteniendo 10-15 células por cada tres experimentos independientes.

Inmunoanálisis por Western blot

Las células crecieron en cajas Petri y después de 24 hr de privación de suero fueron sometidas a las condiciones experimentales, posteriormente fueron lisadas con buffer de lisis enfriado en hielo que contiene: glucosa 270 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortho-vanadato 1 mM, β -glycerol phosphato 1 mM, fluoruro de sodio 5 mM, fosfato de sodio 5 mM, Nonidet-P401%, β -mercaptoethanol 1%, Tris 20 mM e inhibidor de proteasas. Las células fueron cuidadosamente despegadas utilizando un raspador plástico. Los lisados completos fueron sonicados (tres ciclos de 30 seg) y centrifugados a 10,000 rpm a 4°C. La concentración de proteína en los sobrenadantes fue determinada por el método de Bradford. Los lisados totales fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo correspondiente durante toda la noche a 4°C, posteriormente lavados con buffer de lisis y fraccionados por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 8% para después ser transferidos a membranas de nitrocelulosa. La presencia de las proteínas en la membrana fue verificada con Ponceau S. Las transferencias fueron bloqueadas con leche descremada o libre de ácidos grasos e TBS-T 5% y luego probada con los anticuerpos indicados (dilución 1:1000) durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron 4 veces (5 min cada una) con TBS e incubadas por 1 hr en una dilución 1:4000 de anti-IgG acoplada a peroxidasa, lavadas con TBS y reveladas con ECL reagent. La cuantificación de las bandas reactivas del inmunoblot se llevo a cabo escaneando las fluorografías de 5 experimentos independientes del mismo tipo. La integración de las áreas bajo la curva

fueron obtenidas por un software de análisis de geles (ImageJ 1.36b NIH, USA).

Experimentos de liberación de ³H-Taurina

Los fibroblastos src+/+ y SYF cultivados en cajas petri de 35 mm fueron preincubados con ³H-aurina (0.05 µCi/ml) durante 1 hr en medio isosmótico. Después de la incubación, las células fueron lavadas durante 8 min con medio isosmótico y profundidas a 1ml/min por 5 min, con lo cual se logra estabilizar el flujo basal. El medio isosmótico fue reemplazado por el medio experimental y las muestras fueron colectadas por 8 min. Al final de los experimentos, las células fueron lisadas y la radioactividad remanente en las células y en las muestras colectadas fue determinada en un contador de líquido de centelleo. Los resultados fueron expresados como radioactividad liberada por minuto expresada como porcentaje del total incorporado durante la preparación.

Estimación de cambios en el volumen celular

Las mediciones del volumen celular se realizaron estimando cambios relativos en el volumen celular utilizando el sistema de dispersión de luz de ángulo amplio descrito en Pedersen *et al.*, 2002. Primeramente se cambió el medio de cultivo de las cajas con los cubreobjetos por medio isosmótico y se dejó adecuar a las células durante 20 minutos. Los cubreobjetos se introdujeron verticalmente en celdas para espectrofluorómetro con 2 ml de medio isosmótico en un ángulo de 50° respecto a la luz de excitación; se utilizó un espectrómetro de luminiscencia marca Fluoromax-3, Horiba. La excitación se calibró a 585 nm usando una lámpara de Argón-arc y la emisión se detectó a la misma longitud de onda. Después de colocar la celda en el espectrofluorómetro y establecer los parámetros, se comenzó la medición que duró 600 segundos, los primeros 100 segundos se midió la emisión en medio isosmótico para determinar la basal de emisión, después de lo que se diluyó con 1 mL de agua el medio isosmótico que contenía a las células para obtener la hiposmolaridad deseada (H30%).

Análisis estadístico

Los resultados expresan valores promedio ± error estándar; la significancia (P<0.01) fue determinada usando la prueba de t-student o análisis de varianza (ANOVA) y prueba de corrección de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estímulo hiposmótico promueve la fosforilación de Src

Se ha demostrado que la vía de activación de proteínas con actividad de cinasa de tirosina tanto de tipo citosólico (TK) como transmembranales (RTK), así como de cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) tiene una influencia marcada sobre el mecanismo de regulación de volumen. En varios tipos celulares la hiposmolaridad promueve la activación de EGFR, FAK, PI3K, p38 y ERK1/2 (Haussinger y Schliess, 1999; Tilly *et al.*, 1993; de la Paz *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2004; Lezama *et al.*, 2005).

El DRV es un proceso que desencadena una compleja variedad de respuestas celulares, que no necesariamente están relacionadas de manera directa con la recuperación del volumen que se asocian a procesos que van desde sobrevivencia, adhesión a matriz extracelular, hasta mecanismos relacionados con el reacomodo de componentes del citoesqueleto. En consecuencia, la activación hiposmótica de las cinasas antes mencionadas puede estar vinculada a algunas de estas respuestas adaptativas de la célula (Pasantes-Morales y Franco, 2002). Sin embargo, sus interacciones y jerarquía, así como su influencia en las vías de liberación de osmolitos aun no están bien establecidas. Investigaciones anteriores sugieren a la familia de cinasas Src como sitios de convergencia por arriba de la cascada de señalización recibiendo la señal proveniente de integrinas o RTKs y transmitiendo dicha información a la variedad de efectores que requiere la regulación del volumen celular (Cohen *et al.*, 2005).

En el presente estudio se examinó: 1) el requerimiento funcional de la cinasa de tirosina Src sobre el efecto de la hiposmolaridad en la activación del receptor a EGF así como de las cinasas FAK, PI3K, p38 y ERK1/2; 2) la influencia de src en la vía de movilización de osmolitos orgánicos, tomando como representativo la salida de taurina y 3) la capacidad de las células de incrementar su volumen por efecto de una reducción en la osmolaridad del medio extracelular.

Para estudiar el papel que desempeña src dentro de la regulación del volumen, todas las pruebas se llevaron a cabo en una línea celular deficiente de la expresión funcional de los miembros más comunes de familia de cinasas Src: src, Yes y Fyn (células SYF), usando como control la misma línea celular a la cual le fue reexpresado src “células src+/+”. Src es una cinasa de tirosina que se distribuye en la célula de manera citosólica; sin embargo, una vez activada se transloca a la membrana plasmática por miristilación o palmitolación del amino terminal, anclándose a su parte interna. Uno de los estímulos que promueve su activación es el estrés hiposmótico. En la Fig. 1 se observa que mediante ensayos inmunocitoquímicos el estímulo hiposmótico produce en las células src+/+ la translocación de src desde el área perinuclear hasta la membrana plasmática, en particular en las prolongaciones celulares, en donde se une a focos de adhesión y a proteínas del citoesqueleto. En el caso de las células SYF no es apreciable la forma activa de src en ninguna de las condiciones examinadas. Para poder cuantificar la fosforilación de src como respuesta a hiposmolaridad se llevaron a cabo ensayos de Western Blot en las células SYF así como en la línea celular que presenta src reexpresado. Se encontró un incremento del 76% sobre la fosforilación en condiciones isosmóticas en las células src+/+, mientras que en las células SYF, no se observó ningún cambio significativo en la fosforilación evocada por hiposmolaridad (Fig. 1).

Además de identificar la activación de src por efecto de estrés hiposmótico, estos experimentos permiten corroborar que la línea celular SYF con la que se está trabajando no presenta a src en su forma funcional; a partir de esta observación es posible atribuir a esta deficiencia las modificaciones en niveles de fosforilación de otras cinasas y del flujo de taurina.

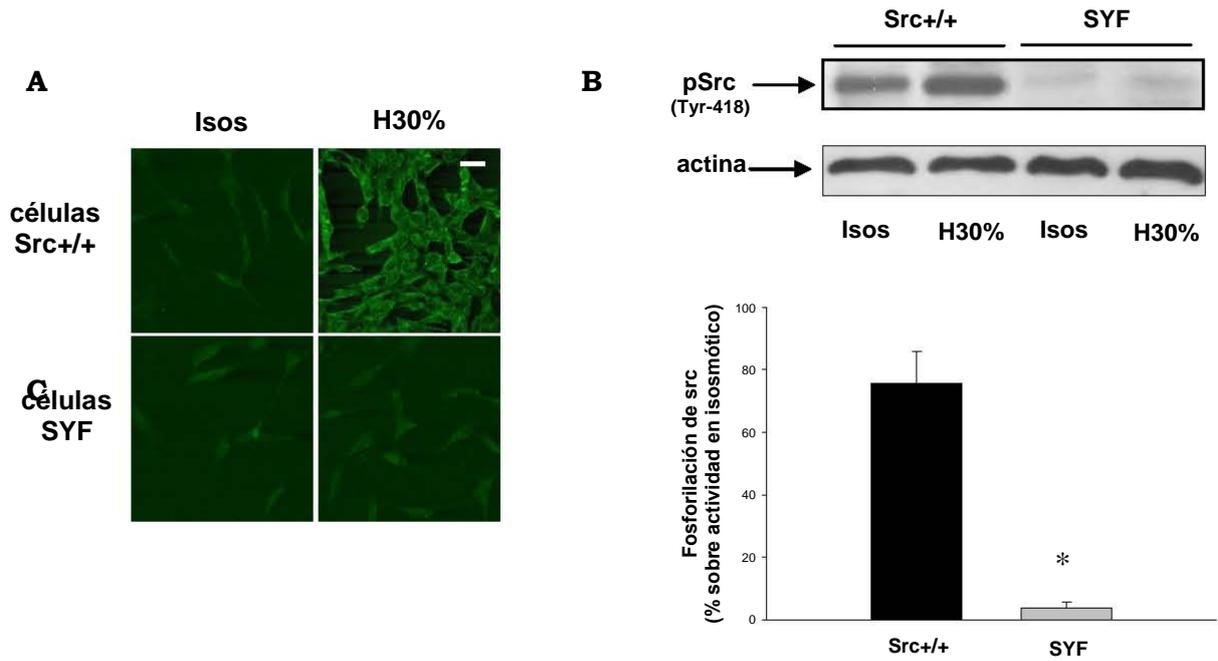


Figura 1 **Incremento en la fosforilación de src inducida por hiposmolaridad en células Src+/+ y SYF.** Condiciones experimentales medio isosmótico (Isos), medio hiposmótico 30% (H30%) (a) Panel derecha: Las células fueron privadas de suero y expuestas a medio isosmótico o medio hiposmótico 30% por 3 min., fijadas e incubadas toda la noche con anti p-Src (pTyr-416). La fosforilación de src fue obtenida con anticuerpo secundario acoplado a FICT y visualizada por microscopia confocal. Barra=50µM (b) Panel superior izquierda: los lisados celulares fueron analizados por inmunoblotting con anticuerpo anti p-Src. (c) Panel inferior izquierda: Los resultados fueron analizados cuantitativamente mediante un escaneo densitométrico con barras representando el porcentaje de incremento en la fosforilación de src en el hiposmótico sobre la condición isosmótica. Resultados expresados como promedio \pm error estandar de n=4-6 experimentos. Diferencias significativas del isosmótico *p < 0.01.

La fosforilación de EGFR inducida por hiposmolaridad es dependiente de Src

El receptor al factor de crecimiento epidermal (EGFR) es un elemento dentro de la transducción de señales osmóticas que es usado como mecanismo para amplificar la respuesta inicial a un cambio en el volumen, funcionando como punto de convergencia de numerosas vías de señalización intracelular (Lezama et al., 2005). En investigaciones previas se ha visto que EGFR es activado por fenómenos de anisotonicidad de manera independiente de ligando (Franco *et al.* 2004), aunque no resulta claro si esta activación es producto del cambio en la osmolaridad del medio, en el volumen de la célula o es una respuesta a una situación de estrés.

Para estudiar el efecto de src sobre la activación de EGFR como resultado del estímulo hiposmótico, se realizaron inmunofluorescencias de manera comparativa en las células src+/+ y SYF. Se observó que en el caso de las células src+/+ la fosforilación de EGFR se incrementa cerca del 60% 1 min. después de que son sometidas al estímulo hiposmótico, el incremento en la fosforilación alcanza un máximo de 97% a los 2 min; y posteriormente disminuye hasta un 33%. En las células SYF no se observan incrementos en la fosforilación de este receptor a ninguno de los tiempos analizados (Fig. 2).

La falta de fosforilación del EGFR en las células SYF indica que src es una señal primaria y que favorece la actividad del receptor. Es posible que una de las alternativas para la activación de EGFR durante hiposmolaridad, sea la interacción con integrinas (Vom Dahl *et al.*, 2003), teniendo como intermediario a la cinasa src. En cultivos de neuronas granulares de cerebelo ya se había reportado que la activación por hiposmolaridad de EGFR se abolía por PP2 inhibidor de src, sugiriendo que la activación de src ocurre por arriba de la fosforilación del receptor a EGFR (Lezama et al., 2005). De esta manera la activación de src puede ser una reacción que este por debajo de la activación de integrina y subsecuentemente transactiva a EGFR de manera directa, o bien a través de p38.

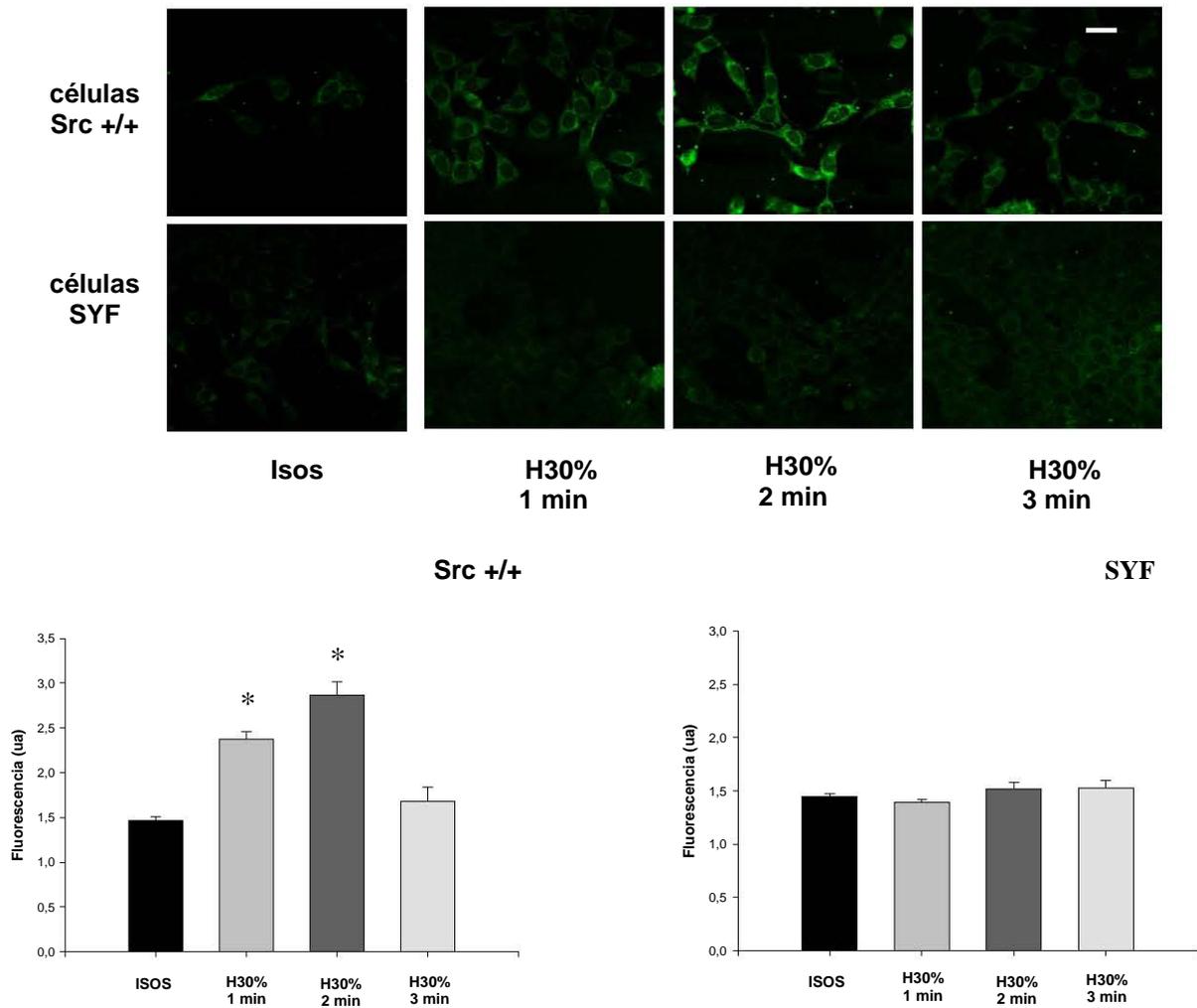


Figura 2 Fosforilación del receptor a EGF inducida por hiposmolaridad en células src+/+ y SYF. Las condiciones experimentales se muestran en la fig. 1 Isos y H30%. (a) Panel superior: Las células fueron privadas de suero y expuestas a medio Isos o H30% por 1, 2 y 3 min., fijadas, incubadas toda la noche con anti p-EGFR(p-Tyr 1173). La fosforilación de EGFR fue obtenida con anticuerpo secundario acoplado a FICT y visualizada por microscopía confocal. Barra = 50 μ M (b) Panel inferior: la intensidad de fluorescencia fue medida usando el programa image-pro plus 5.0 (media cybernetics, San Diego, CA) de las imágenes obtenidas por microscopía confocal. Cinco muestras de de 10-12 células cada una fueron analizadas de tres experimentos independientes. La intensidad de fluorescencia es expresada como unidades arbitrarias. Resultados expresados como promedio \pm error estandar de n=4-6 experimentos. Diferencias significativas del isosmótico *p < 0.01.

Activación de la cinasa de focos de adhesión (FAK) mediada por la actividad de Src.

Cuando una célula es expuesta a un medio hiposmótico se presenta un incremento en su volumen celular acompañado de la reorganización a nivel de los componentes del citoesqueleto, así como de la activación de reacciones encaminadas a procesos de adhesión celular. La cinasa de focos de adhesión p125FAK y src participan mediando estas respuestas en varios tipos celulares (Tilly *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2001; Ochoa *et al.*, 2002). En el presente estudio, se midió el incremento en la fosforilación de FAK por efecto de hiposmolaridad de manera comparativa en las células SYF y src+/+. En las células que expresan a src funcional, la fosforilación se incrementa considerablemente, alcanzando un 82% sobre el nivel en el medio isosmótico. En el caso de las células SYF la activación de FAK corresponde a un 14% (Fig. 3).

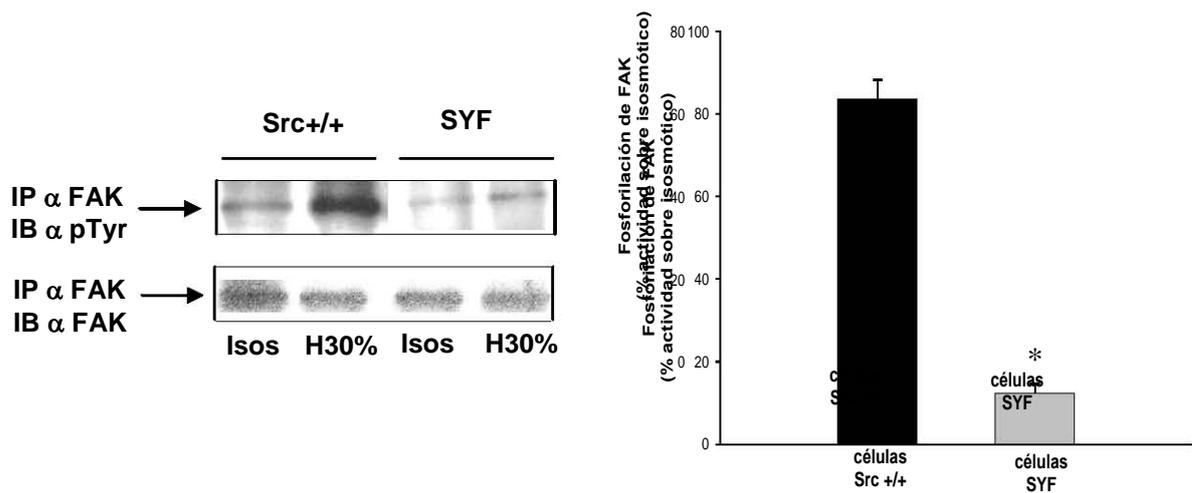


Figura 3 **Efecto de la hiposmolaridad sobre la fosforilación de FAK probada por inmunoblot.** Las condiciones experimentales se muestran en la fig. 1 Isos y H30%. (a) Panel izquierda: IP con anticuerpo anti-FAK e IB con anticuerpo pTyr . (b) Panel derecha: los resultados fueron analizados cuantitativamente mediante un escaneo densitométrico con barras que representan el porcentaje de incremento en al fosforilación de FAK en el hiposmótico sobre el control isosmótico. Resultados expresados como promedio \pm error estandar de n=4-6 experimentos. Diferencias significativas del isosmótico por *p < 0.001.

En varios modelos celulares, se ha descrito ampliamente una estrecha relación entre FAK y los miembros de la familia de Src por debajo de la señalización de integrinas. La fosforilación de FAK crea sitios de unión de alta afinidad para las cinasas de la familia de Src, permitiendo la interacción con un gran número de efectores que presentan dominios SH2. El reclutamiento de miembros de la familia de Src hace accesible la asociación con paxilina y el sustrato asociado a Crk, lo cual permite finalmente la regulación de las GTPasas de la familia de Rho contribuyendo a la motilidad celular y al reacomodo de los filamentos de actina (Schaller *et al.*, 1994). Sin embargo, los resultados del presente estudio muestran la dramática reducción de la fosforilación de FAK en las células SYF sugieren fuertemente que su fosforilación ocurre por debajo de la activación de Src en respuesta a un estímulo hiposmótico. Estos resultados indican que src tiene un papel predominante en los eventos relacionados con la señalización de FAK, entre los que destaca la formación de focos de adhesión y el reacomodo de elementos del citoesqueleto.

Influencia de Src sobre la activación por hiposmolaridad de las MARKs: ERK1/2 y p38

Además de las cinasas de tirosina, otro tipo de cinasas son activadas por hiposmolaridad en distintos tipos celulares, como las MAP cinasas ERK1/2 y p38 que se encargan de mediar respuestas de estrés y sobrevivencia.

La activación de ERK 1/2 por estrés hiposmótico ha sido descrita en diferentes tipos celulares, como en astrocitos (Schliess *et al.*, 1996; Crepel *et al.*, 1998; Cardin *et al.*, 2003) y neuronas granulares de cerebelo (Morales-Mulia *et al.*, 2001). En las líneas celulares manejadas en este trabajo, los resultados de la medición de la fosforilación de ERK1/2 por efecto de un estímulo hiposmótico mediante Western blot muestran un incremento de 78% en la fosforilación en las células src +/+. En las células SYF no se observó la fosforilación de esta MAPK que se encuentran incluso por debajo de la condición isosmótica (Fig. 4).

Las células SYF presentan una disminución característica en los niveles de proliferación, lo cual podría explicarse por la notable falta de actividad de ERK1/2, cinasa activada por mitogenos que esta directamente implicada en fenómenos de división celular y que a su vez, se relaciona de forma muy estrecha con EGFR dentro de la cascada de señalización que dirige la proliferación de las células. Ya que la fosforilación de este receptor esta considerablemente disminuida en este tipo celular, todas las señales que van por debajo de él se ven directamente influenciadas.

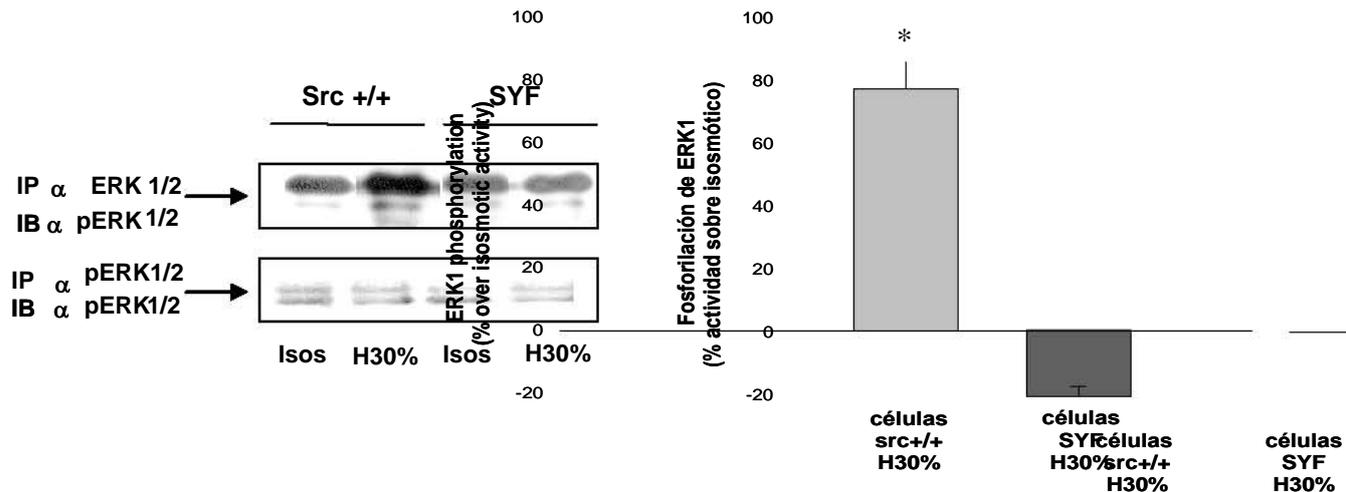


Figura 4 **Incremento en la fosforilación de ERK1/2 inducida por hiposmolaridad en células src+/+ y SYF.** Condiciones experimentales como en la Fig. 1 Isos, H30% (a) Panel izquierda: IP con anticuerpo anti-ERK 1/2 e IB con anti p-ERK 1/2 (p-Tyr 204) (b) Panel derecha: los resultados fueron analizados cuantitativamente mediante un escaneo densitométrico con barras representando el porcentaje de incremento en la fosforilación de ERK1/2 en el hiposmótico sobre la condición isosmótica bajo las condiciones indicadas. Resultados expresados como promedio \pm error estandar de n=4-6 experimentos. Diferencias significativas del isosmótico *p < 0.001.

En el caso de p38 en las células src+/+ se presenta una fosforilación rápida después de que son estimuladas con medio hiposmótico incrementándose en un 100% 1 min. después del estímulo. En cambio, en las células SYF no se observó un incremento en la fosforilación evocada por hiposmolaridad (Fig.5). La MAP cinasa p38 responde a señales de estrés y es fosforilada de manera consistente por fenómenos de anisotonicidad en varios tipos celulares. Su bloqueo mediante el uso de inhibidores como SB203580 produce una disminución de la actividad de EGFR por hiposmolaridad (Cheng *et al.*, 2002),

sugiriendo su papel como modulador de la señalización del receptor a EGFR, lo cual podría explicar que p38 se active a tiempos más cortos, posiblemente, recibiendo la señal directa de la molécula que funciona como sensor de cambios en el volumen celular.

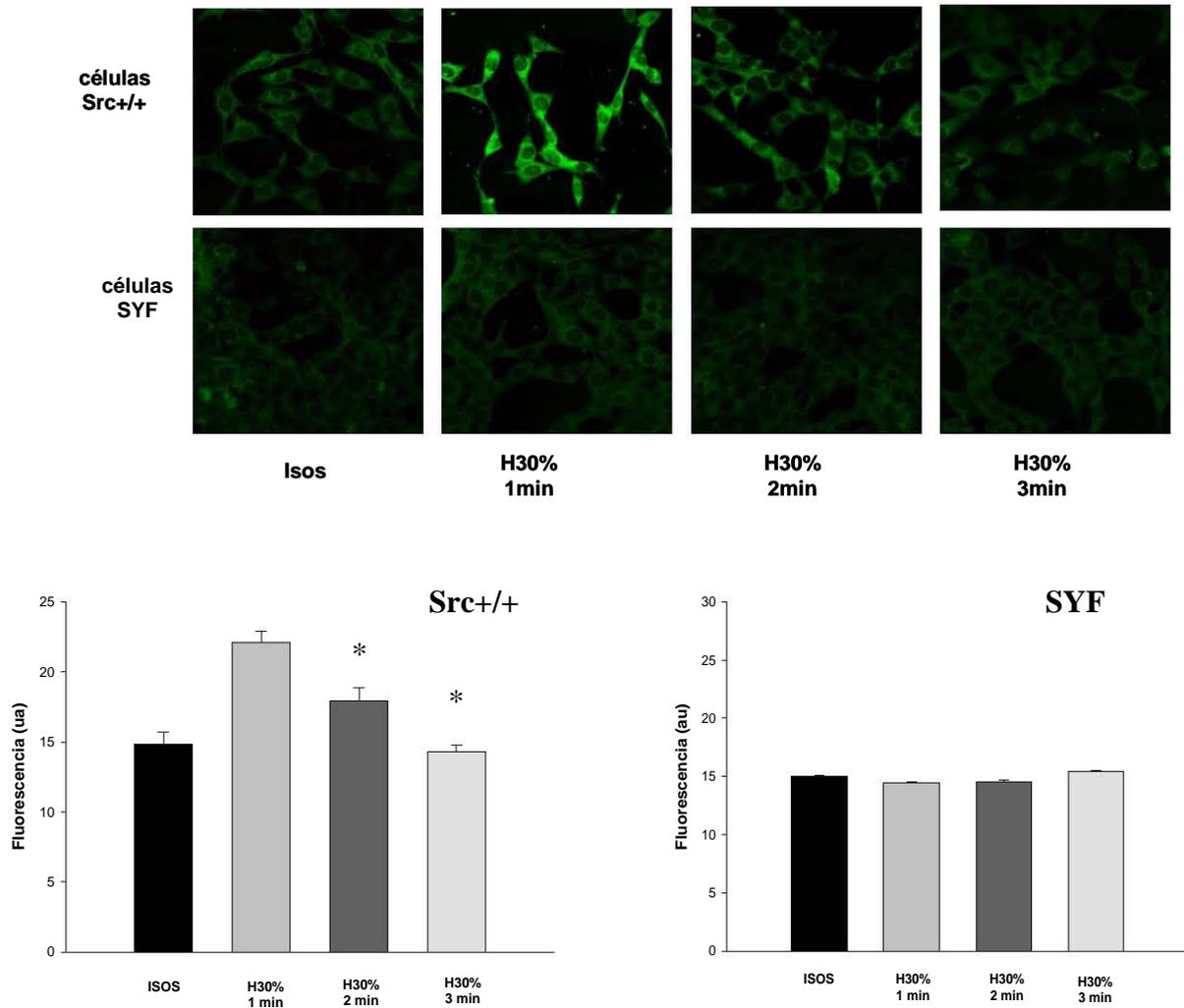


Figura 5 **Activación por tiempo de P38 mediada por hiposmolaridad en células src+/+ y SYF.** Condiciones experimentales como se indica en la Fig. 1 Isos, H-30% 1, 2 y 3 min. (a) Panel superior: Las células fueron privadas de suero y expuestas a medio Isos o medio H30% por 1,2 y 3 min., fijadas, incubadas toda la noche con anti p-P38 (p-Thr 180, pTyr 182). La fosforilación de P38 fue obtenida con anticuerpo secundario acoplado a FICT y visualizada por microscopia confocal. Barra = 50µM (b) Panel inferior: la intensidad de fluorescencia fue medida como se indica en la figura 2 y es expresada como unidades arbitrarias. Resultados expresados como promedio \pm error estandar de n=4-6 experimentos. Diferencias significativas del isosmótico *p < 0.001.

Src interviene en respuestas de supervivencia mediante la activación de PI3K

La vía de PI3K/Akt es activada por una variedad de estímulos y esta implicada en un amplio rango de procesos celulares incluyendo crecimiento, proliferación, motilidad y sobre todo supervivencia celular (Liu *et al.*, 2001). Su activación por hiposmolaridad ha sido reportada en varios tipos celulares; en astrocitos (Cardin *et al.* 2003), hepatoma (Feranchak *et al.*, 1998), células PSMC (Kim *et al.*, 2001), neuronas granulares de cerebelo (Morales-Mulia *et al.*, 2001), fibroblastos Swiss 3T3 (Franco *et al.*, 2004) y retina (Ochoa *et al.*, 2002).

La activación de PI3K, fue medida mediante la fosforilación de AKT, un sustrato de PI3 cinasa. En la figura 6 se observa como AKT incrementa su fosforilación, alcanzando un incremento del 56% en las células src+/+. En el caso de las células SYF se observa una diferencia en la fosforilación de únicamente un 11% con respecto al control isosmótico. Esta reacción podría significar una respuesta rápida de supervivencia evocada por PI3K ante una condición de estrés que podría estar poniendo en riesgo la integridad celular; o bien podría ser una respuesta dirigida a la movilización de osmolitos, como se discutirá más adelante

Por otra parte, otros blancos importantes de los productos de PI3K son las GTPasas Rac y Rho, las cuales coordinan la dinámica de la organización del citoesqueleto de actina y el ensamble a estructuras asociadas a integrinas. Rho regula la formación de fibras de estrés y adhesiones focales mientras que Rac controla el ensamble de los complejos focales y puede activar los cambios en el citoesqueleto mediados por Rho (Cantrell, 2001)

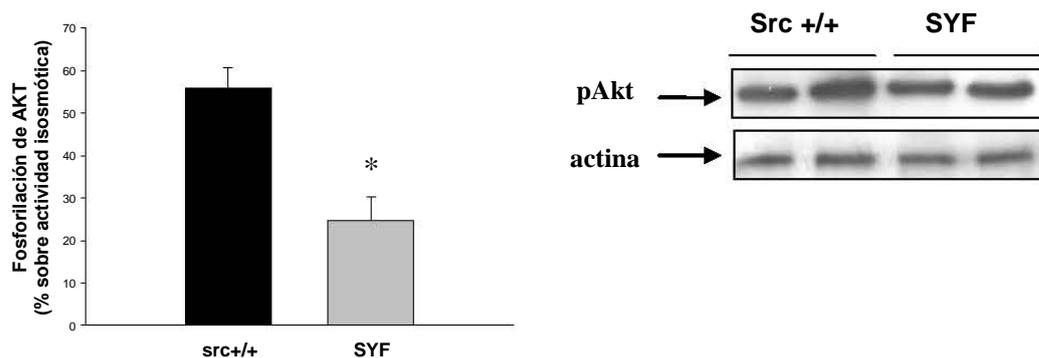


Figura 6 **Activación de PI3K por hiposmolaridad en células src+/+ y SYF.** La activación de PI3K fue seguida mediante la fosforilación de AKT como se describe en los métodos. Condiciones experimentales: ISOS, H30% 1, 2 y 3 min. (a) Panel izquierda: IB anticuerpo anti-p-AKT (Ser-473). (b) Panel derecha: se llevó a cabo el análisis cuantitativo de los resultados por escaneo densitométrico, las barras representan un incremento en la fosforilación de AKT por medio hiposmótico sobre el medio isosmótico, bajo los tiempos indicados. Resultados expresados como promedio \pm error estandar de n=4–6 experimentos. Diferencias significativas del isosmótico * $p < 0.01$.

Flujo de osmolitos

Src media la liberación osmosensible de taurina.

La activación de las cinasas por hiposmolaridad es un fenómeno coincidente con el hinchamiento, que no necesariamente implica su relación con la activación de flujos osmóticos. Por ello, se investigó el papel de Src sobre mecanismos efectores del DRV examinando inicialmente como afecta la expresión funcional de src el flujo de taurina activado por hiposmolaridad. En las células src+/+, la reducción de 30% en la osmolaridad de medio produce un marcado incremento en el flujo de ^3H -taurina. La liberación de taurina en condiciones isosmóticas (0.3% de la liberación basal en isosmótico) alcanzó un pico de liberación del 2.9% 3 min posteriores al estímulo hiposmótico, seguido de una fase de inactivación lenta. La liberación neta corresponde a un 12%.

Las células SYF presentaron una menor respuesta a la hiposmolaridad en cuanto a la liberación osmosensible de taurina, alcanzando una liberación máxima de 0.6% 3 min después de la reducción de la osmolaridad del medio. En la figura 7 se muestra como la liberación de taurina disminuye en un 72% con respecto a las células src+/+.

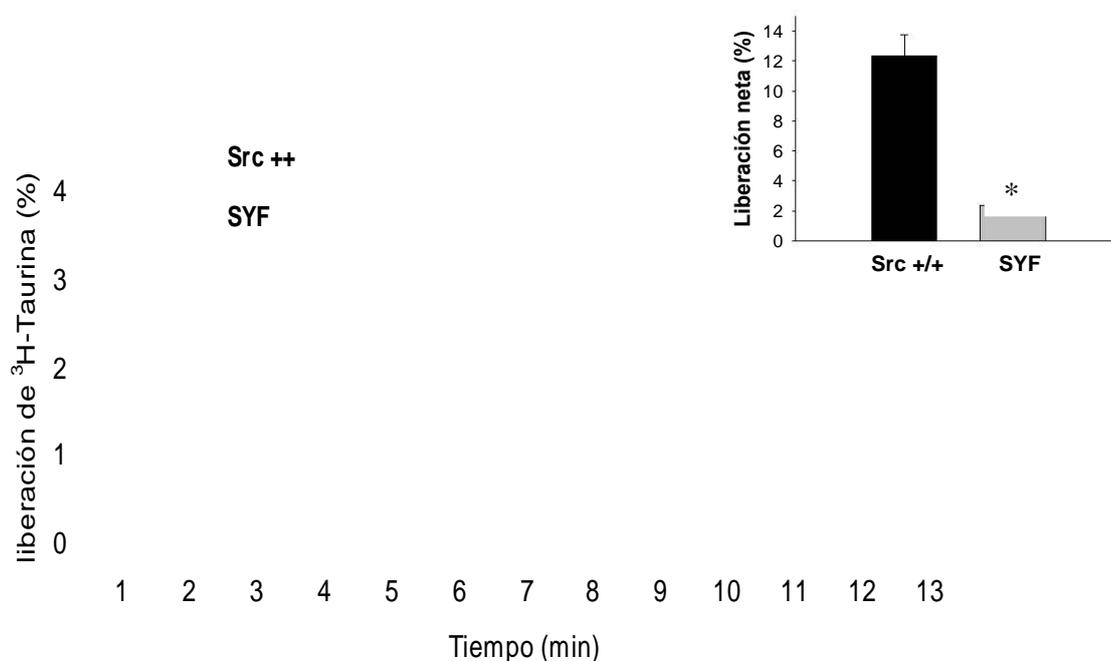


Figura 7 **Liberación de taurina inducida por hiposmolaridad (LHT) en células src+/+ y SYF.** Las células fueron preincubadas con ³H-taurina, profundidas con medio Isosmótico durante 5 min. y posteriormente durante 8 min. con medio H30%. Los datos muestran la liberación de radioactividad a cada tiempo, expresado como porcentaje de la radioactividad total acumulada durante la incubación. Las barras representan la liberación de ³H-Taurina en los cinco puntos máximos menos cinco puntos en la liberación en condición isosmótica (Liberación neta). Resultados expresados como promedio \pm error estandar de 3-8 experimentos. Diferencias significativas *p < 0.01.

La influencia de las cinasas de tirosina en el flujo osmosensible de taurina ha sido documentada en una variedad de tipos celulares, inhibiéndose de manera consistente por bloqueadores generales de estas cinasas y mostrando una clara potenciación por efecto de inhibidores de fosfatasa de tirosina. (Deleuze *et al.*, 2000; Monguin *et al.*, 1999; Morales-Mulia *et al.*, 2001; Franco *et al.* 2004; Lezama *et al.* 2005). Los fármacos AG1478 y AG112, específicos para

receptores de la familia de cinasas de tirosina muestran un efecto claramente inhibitor sobre el flujo de taurina. Esto podría indicar que la disminución en la liberación de taurina en este tipo celular puede deberse a la carencia funcional de src como activador de la vía de movilización de dicho aminoácido, o bien, podría ser efecto de la falta de activación del EGFR en ausencia de src.

La actividad de src es determinante para el proceso de incremento en volumen

A través del sistema de dispersión de luz de ángulo amplio descrito en Pedersen *et al.* (2002) se llevaron a cabo las estimaciones en el cambio en volumen celular, encontrando que las células src^{+/+} incrementan su volumen en un 9.8 % como respuesta a la reducción de un 30% de la osmolaridad del medio extracelular. Comparativamente, en las células SYF el incremento de volumen corresponde solamente a un 3.9 % frente a un estímulo hiposmótico (Fig. 8).

Estos datos podrían indicar una disminución en la capacidad de las células SYF para incrementar su volumen frente a un choque hiposmótico, lo cual refleja la importancia de la cinasa Src en la correcta organización del citoesqueleto.

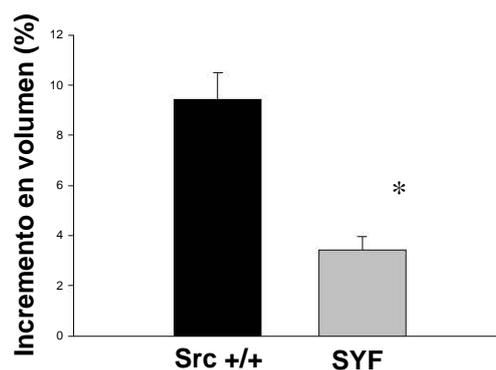


Figura 8 **Efecto de la deficiencia de src sobre el incremento en el volumen celular evocado por hiposmolaridad en las líneas celulares src^{+/+} y SYF.** Las barras corresponden al porcentaje de hinchamiento en cada tipo celular por efecto de una reducción del 30% en la osmolaridad del medio y son expresados como promedio \pm error estandar de n= 8-12. Diferencias significativas *p < 0.01.

Las observaciones más significativas del presente estudio en células src +/+ y SYF son: i) la activación por hiposmolaridad de las cinasas FAK, ERK1/2, p38, así como de las cinasa blanco PI3K y el receptor a EGF de manera parcialmente dependiente de la actividad de src y ii) el efecto de la carencia funcional de src reduciendo el flujo de taurina evocado por hiposmolaridad

La marcada disminución en las células SYF del flujo osmosensible de osmolitos orgánicos, teniendo como representativo a la taurina, puede estar relacionada con la mermada capacidad de estas células para incrementar su volumen. En este contexto el binomio integrinas/src estaría actuando como importante modulador. La activación de src puede ocurrir vía integrinas y a pesar de que esta relación esta claramente documentada en varios tipos celulares (Moro *et al.* 2002; Schliess *et al.*, 2004), el fenómeno no resulta ser tan claro durante hiposmolaridad. Sin embargo se sabe que durante la migración celular las integrinas tienen como efectores cascada abajo a src y a Rho GTPasas que regulan la dinámica del citoesqueleto de actina mediante diversos efectores (Burridge *et al.*, 2004), como Cdc42, Rac1 y RhoA (Cox *et al.*, 2001) A través de la acción coordinada de la activación e inhibición de las Rho GTPasas src participa como un regulador del citoesqueleto (Ridley *et al.* 2003), activando Cdc42 y Rac 1 (Servitja *et al.* 2003) e inhibiendo a RhoA (Arthur *et al.*, 2000) para permitir la protrusión de la membrana, posteriormente, RhoA es reactivada (Ren *et al.*, 1999) formando fibras de estrés y brindándole la fuerza contráctil a la célula necesaria para su movilización, en este proceso también es reclutado src para la regulación de la formación de adhesiones focales vía FAK (Volberg *et al.*, 2001) y finalmente Rho permite el desensamble de estas adhesiones focales de manera dependiente de src (Webb *et al.* 2004). De esta forma la deficiencia de src en las células SYF podría estar alterando la dinámica de reorganización del citoesqueléto necesaria tanto para el incremento del volumen celular ante fenómenos de hiposmolaridad, como para la recuperación del volumen; posiblemente, en estas células no se alcanza un nivel umbral de hinchamiento necesario para permitir la activación del flujo correctivo de volumen de taurina, ni para desencadenar toda la cascada de señalización que le permite a la célula hacer frente a las condiciones del medio extracelular.

Sin embargo, otra de las alternativas en cuanto al flujo de osmolitos orgánicos es que la vía de movilización de la taurina activada por hinchamiento se

comporte de manera similar al intercambiador aniónico banda 3 en eritrocitos de raya, donde el intercambiador es translocado a la membrana, oligomeriza y posteriormente interactúa con ankirina y la proteína banda 4.1; dicha interacción se asocia directamente a la actividad de las cinasas de tirosina de la familia de src: Syk y Lyn, posibilitando de esta forma la liberación de taurina (Musch y Goldstein, 2005).

Por otra parte, cabe destacar que recientes trabajos de este laboratorio, así como de otros grupos de investigación presentan evidencia de que la participación de las cinasas de tirosina en la movilización de osmolitos orgánicos es dependiente del tipo celular, por ejemplo en fibroblastos swiss 3T3 la liberación de taurina es dependiente de la actividad de EGFR y Src (Vazquez-Juarez *et al.*, 2007) mientras que en el caso de astrocitos de cerebelo en cultivo, el bloqueo de la activación de estas cinasas tiene una influencia menor en la liberación tanto de taurina como de glutámato (sin publicar).

A partir de estos datos, es posible suponer que la activación de src puede ser un elemento inicial en los procesos de reacomodo del citoesqueleto desencadenados por hiposmolaridad, así como también formar parte de la cascada de señalización requerida para la activación del flujo osmosensible de taurina. Aún así, quedan muchos aspectos por aclarar en estas líneas celulares en cuanto a la participación de las cinasas de tirosina en el proceso de regulación del volumen, por ejemplo: i) el mecanismo de activación de src durante hinchamiento hiposmótico, el cual aún no se conoce de manera concreta, aunque se descarta la posibilidad de un único elemento activador. Por una parte pueden estar involucrados los receptores acoplados a proteínas G fosforilación directa por G_{α} , $G_{\beta\gamma}$ o β -arrestina, así como la interacción con las integrinas, ii) examinar el papel de Fyn y Yes mediante la reintroducción de estas cinasas en las células src+/+ iii) estudiar de manera más detallada la relación src/FAK, así como la activación de la vía de las Rho GTPasas.

CONCLUSIONES

Mediante el presente estudio se logró determinar el papel de la cinasa de residuos de tirosina de tipo citosólico Src en la cascada de señalización activada por incremento en el volumen celular mediante un estímulo hiposmótico, así como la corrección de volumen mediada por el flujo de osmolitos orgánicos.

El estrés hiposmótico incrementó la fosforilación de las cinasas FAK, ERK, P38, PI3K y del receptor al EGF, viéndose disminuida en las células deficientes de src. En cuanto a la liberación de taurina el déficit de src produjo una notable disminución en la salida de dicho aminoácido.

Los resultados obtenidos indican la importancia de src en las respuestas inducidas por estímulo hiposmótico, sobre todo en el reaerreglo del citoesqueleto y adhesión celular, las cuales estarían modulando otros mecanismos celulares como, respuesta a estrés y sobrevivencia, así como el flujo correctivo de volumen de taurina.

REFERENCIAS

- Abdullaev IF., Rudkouskaya A., Schools GP., Kimelberg HK. y Mongin AA. 2006. Pharmacological comparison of swelling-activated excitatory amino acid release and Cl⁻ currents in cultured rat astrocytes. *J. Physiol.* 572:677-689.
- Abdullaev IF., Sabirov RZ. y Okada Y. 2003. Upregulation of swelling-activated Cl⁻ channel sensitivity to cell volume by activation of EGF receptors in murine mammary cells. *J Physiol* 549:749-758.
- Abram CL. y Courtneidge SA. 2000. Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res.* 254:1-13
- Alfieri RR. y Petronini PG. 2007. Hyperosmotic stress response: comparison with other cellular stresses. *Pflugers Arch.* 454(2):173-85.
- Alioua A., Mahajan A., Nishimaru K., Zarei MM., Stefani E. y Toro L. 2002. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(22):14560-5.
- Arthur WT., Petch LA. y Burridge K. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol.* 10(12):719-22.
- Balaban RS. y Burg MB. 1987. Osmotically active organic solutes in the renal inner medulla. *Kidney Int.* 31:562-564.
- Bowlby MR., Fadool DA., Holmes TC. y Levitan IB. 1997. Modulation of the Kv1.3 potassium channel by receptor tyrosine kinases. *J Gen Physiol* 110:601-610.
- Bres V., Hurbin A., Duvoid A., Orcel H., Moos FC., Rabie A. y Hussy N. 2000. Pharmacological characterization of volume-sensitive, taurine permeable anion channels in rat supraoptic glial cells. *Br J Pharmacol.* 130:1976-82.
- Bromann PA., Korkaya H. y Courtneidge SA. 2004. The interplay between Src family kinases and receptor tyrosine kinases. *Oncogene.* 23:7957-68.

Brown MT. y Cooper JA. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim Biophys Acta*. 1287(2-3):121-49.

Bryan-Sisneros A., Sabanov V., Thoroed S.M. y Doroshenko P. 2000. Dual role of ATP in supporting volumeregulated chloride channels in mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 1468:63-72.

Burrige K. y Wennerberg K. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 116(2):167-79.

Cantrell DA. 2001. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci*. 114(Pt 8):1439-45.

Cardin V., Lezama R., Torres-Márquez ME. y Pasantes-Morales H. 2003. Potentiation of osmosensitive taurine release and cell volume regulation by Ca^{2+}_i rise in cultured cerebella astrocytes. *Glia* 44:119-128.

Cardin V., Pena-Segura C. y Pasantes-Morales H. 1999. Activation and inactivation of taurine efflux in hyposmotic and isosmotic swelling in cortical astrocytes: role of ionic strength and cell volume decrease. *J Neurosci Res*. 56:659-67.

Cheng HF. y Harris RC. 2002. Cyclooxygenase-2 expression in cultured cortical thick ascending limb of Henle increases in response to decreased extracellular ionic content by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Role of p38-mediated pathways. *J Biol Chem*. 277(47):45638-43.

Cohen DM. 2005. SRC family kinases in cell volume regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 288:C483-C493.

Cook KK. y Fadool DA. 2002. Two adaptor proteins differentially modulate the phosphorylation and biophysics of Kv1.3 ion channel by SRC kinase. *J Biol Chem* 277:13268-13280.

Cox EA., Sastry SK. y Huttenlocher A. 2001. Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell.* 2:265-77.

Crepel V., Panenka W., Kelly M.E. y MacVicar BA. 1998. Mitogen-activated protein and tyrosine kinases in the activation of astrocyte volume-activated chloride current. *J Neurosci.* 18:1196–1206.

de La Paz LD., Lezama R., Torres-Marquez ME. y Pasantes-Morales H. 2002. Tyrosine kinases and amino acid efflux under hyposmotic and ischaemic conditions in the chicken retina. *Pflugers Arch.* 445:87-96.

Deleuze C., Duvoid A., Moos FC. y Hussy N. 2000. Tyrosine phosphorylation modulates the osmosensitivity of volume-dependent taurine efflux from glial cells in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol.* 523:291-9.

Deutsch C. y Chen LQ. 1993. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:10036–10040.

Du XL., Gao Z. y Lau CP. 2004. Differential effects of tyrosine kinase inhibitors on volume-sensitive chloride current in human atrial myocytes: evidence for dual regulation by Src and EGFR kinases. *J Gen Physiol.* 123:427–439.

Fadool DA. y Levitan IB. 1998. Modulation of olfactory bulb neuron potassium current by tyrosine phosphorylation. *J Neurosci.* 18:6126–6137.

Feranchak AP., Roman RM., Schwiebert EM. y Fitz JG. 1998. Phosphatidylinositol 3-kinase contributes to cell volume regulation through effects on ATP release. *J Biol Chem.* 273(24):14906-11.

Franco R., Lezama R., Ordaz B. y Pasantes-Morales H. 2004a. Epidermal growth factor receptor is activated by hyposmolarity and is an early signal modulating osmolyte efflux pathways in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch.* 447:830-9.

Franco R., Rodriguez R. y Pasantes-Morales H. 2004b. Mechanisms of the ATP potentiation of hyposmotic taurine release in Swiss 3T3 fibroblasts. *Pflugers Arch.* 449:159-69.

Franco R., Torres-Marquez ME. y Pasantes-Morales H. 2001. Evidence for two mechanisms of amino acid osmolyte release from hippocampal slices. *Pflugers Arch* 442:791– 800.

Fürst J., Gschwentner M., Ritter M., Bottà G., Jakab M., Mayer M., Garavaglia L., Bazzini C., Rodighiero S., Meyer G., Eichmüller S., Wöll E. y Paulmichl M. 2002. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers Arch.* 444(1-2):1-25.

Gamper N., Stockand JD. y Shapiro MS. 2003. Subunit-specific modulation of KCNQ potassium channels by Src tyrosine kinase. *J Neurosci.* 23: 84–95.

Garcia JJ., Sanchez-Olea R. y Pasantes-Morales H. 1991. Taurine release associated to volume regulation in rabbit lymphocytes. *J Cell Biochem.* 45:207-212.

Grinstein S., Clarke CA., Dupre A. y Rothstein A. 1982. Volume-induced increase of anion permeability in human lymphocytes. *J Gen Physiol.* 80:801-823.

Gulbins E., Szabo I., Baltzer K. y Lang F. 1997. Ceramide-induced inhibition of T lymphocyte voltage-gated potassium channel is mediated by tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 7661–7666.

Hallows KR. y Knauf PA. 1994. Regulatory volume decrease in HL-60 cells: importance of rapid changes in permeability of Cl⁻ and organic solutes. *Am J Physiol.* 267(4 Pt 1):C1045-56.

Haussinger D. y Schliess F. 1999. Osmotic induction of signaling cascades: role in regulation of cell function. *Biochem Biophys Res Commun.* 255:551-5.

Haussinger D., Reinehr R. y Schliess F. 2006. The hepatocyte integrin system and cell volume sensing. *Acta Physiol (Oxf).* 187:249-55.

Hoffmann EK. y Pedersen SF. 2006. Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation. *Contrib Nephrol.* 152:54-104.

Hoffmann EK. y Simonsen LO. 1989. Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells. *Physiol Rev.* 69(2):315-82.

Hubert EM., Musch MW. y Goldstein L. 2000. Inhibition of volume-stimulated taurine efflux and tyrosine kinase activity in the skate red blood cell. *Pflugers Arch.* 440(1):132-9.

Huxtable RJ. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev.* 72:101-63.

Jackson PS. y Strange K. 1993. Volume-sensitive anion channels mediate swelling-activated inositol and taurine efflux. *Am J Physiol.* 265:C1489-500.

Jacobsen JG. y Smith LH. 1968. Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives. *Physiol Rev.* 48:424-511.

Jakab M., Furst J., Gschwentner M., Botta G., Garavaglia ML., Bazzini C., Rodighiero S., Meyer G., Eichmueller S., Woll E., Chwatal S., Ritter M. y Paulmichl M. 2002. Mechanisms sensing and modulating signals arising from cell swelling. *Cell Physiol Biochem.* 12:235-58.

Junankar PR. y Kirk K. 2000. Organic osmolyte channels: a comparative view. *Cell Physiol Biochem.* 10:355-60.

Kim LT., Wu J. y Turnage RH. 2001. FAK induction in keratinocytes in an in vitro model of reepithelialization. *J Surg Res.* 96(2):167-72.

Klinghoffer RA., Sachsenmaier C., Cooper JA. y Soriano P. 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J.* 18(9):2459-2471.

Koomoa DL., Musch MW., MacLean AV. y Goldstein L. 2001. Volume-activated trimethylamine oxide efflux in red blood cells of spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281:R803-R810.

Lambert IH. 2004. Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells. *Neurochem. Res.* 29: 27-63.

Lang F. 1998. The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol.* 141:281-286.

Lang F., Busch GL., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E. y Haussinger D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 78:247-306.

Lang F., Madlung J., Bock J., Lukewille U., Kaltenbach S., Lang KS., Belka C., Wagner CA., Lang HJ., Gulbins E. y Lepple-Wienhues A. 2000. Inhibition of Jurkat-T-lymphocyte Na⁻/H⁺-exchanger by CD95(Fas/Apo-1)-receptor stimulation. *Pflugers Arch.* 440: 902-907.

Lezama R., Ortega A., Ordaz B. y Pasantes-Morales H. 2005. Hyposmolarity-induced ErbB4 phosphorylation and its influence on the non-receptor tyrosine kinase network response in cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem.* 93:1189-98.

Lepple-Wienhues A., Szabo I., Laun T., Kaba NK., Gulbins E. y Lang F. 1998. The tyrosine kinase p56lck mediates activation of swelling-induced chloride channels in lymphocytes. *J Cell Biol.* 141: 281-286.

Liedtke W. 2005. TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Pflugers Arch.* 451:176-80.

Ling S., Sheng JZ. y Braun AP. 2004. The calcium-dependent activity of large conductance, calcium-activated K₊ channels is enhanced by Pyk2 and Hck-induced tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287: C698-C706.

Liu W., Bagaitkar J. y Watabe K. 2007. Roles of AKT signal in breast cancer. *Front Biosci.* 12:4011-9.

Lowell CA. y Soriano P. 1996. Knockouts of Src-family kinases: stiff bones, wimpy T cells, and bad memories. *Genes Dev.* 10(15):1845-57.

Ma YC., Huang J., Ali S., Lowry W. y Huang XY. 2000. Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell*. 102:635-46.

MacFarlane SN. y Sontheimer H. 2000. Modulation of Kv1.5 currents by Src tyrosine phosphorylation: potential role in the differentiation of astrocytes. *J Neurosci*. 20: 5245-5253.

Martin GS. 2001. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol*. (6):467-75.

Mason HS., Latten MJ., Godoy LD., Horowitz B. y Kenyon JL. 2002. Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. *Mol Pharmacol*. 61, 285-293.

McCarty NA. y O'Neil RG. 1992. Calcium signaling in cell volume regulation. *Physiol Rev*. 72:1037-61.

Mongin AA., Reddi JM., Charniga C. y Kimelberg HK. 1999. [3H]taurine and D-[3H]aspartate release from astrocyte cultures are differently regulated by tyrosine kinases. *Am J Physiol*. 276:C1226-30.

Morales-Mulia S., Cardin V., Torres-Marquez ME., Crevenna A. y Pasantes-Morales H. 2001. Influence of protein kinases on the osmosensitive release of taurine from cerebellar granule neurons. *Neurochem Int*. 38:153-61.

Morán J., Miranda D., Peña-Segura C. y Pasantes-Morales H. 1997. Volume regulation in NIH/3T3 cells not expressing P-glycoprotein II. Chloride and amino acid fluxes. *Am J Physiol*. 272(6 Pt 1):C1804-9.

Moro L., Dolce L., Cabodi S., Bergatto E., Boeri-Erba E., Smeriglio M., Turco E., Retta SF., Giuffrida MG., Venturino M., Godovac-Zimmermann J., Conti A., Schaefer E., Beguinot L., Tacchetti C., Gaggini P., Silengo L., Tarone G. y Defilippi P. 2001. Integrin-induced epidermal growth factor (EGF) receptor activation requires c-Src and p130Cas and leads to phosphorylation of specific EGF receptor tyrosines. *J Biol Chem*. 277(11):9405-14.

Musch MW. y Goldstein L. 2005. Tyrosine kinase inhibition affects skate anion exchanger isoform I alterations after volume expansion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288:R885–R890.

Musch MW., Hubert EM. y Goldstein L. 1999. Volume expansion stimulates p72(syk) and p56(lyn) in skate erythrocytes. *J Biol Chem.* 274:7923–7928.

Niemeyer MI., Cid LP. y Sepulveda FV. 2001. K⁺ conductance activated during regulatory volume decrease. The channels in Ehrlich cells and their possible molecular counterpart. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130:565-75.

Nilius B., Eggermont J., Voets T., Buyse G., Manolopoulos V. y Droogmans G. 1997. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 68:69-119.

Nitabach MN., Llamas DA., Araneda RC., Intile JL., Thompson IJ., Zhou YI. y Holmes TC. 2001. A mechanism for combinatorial regulation of electrical activity: potassium channel subunits capable of functioning as Src homology 3-dependent adaptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 705–710.

Nitabach MN., Llamas DA., Thompson IJ., Collins KA. y Holmes TC. 2002. Phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent modes of modulation of shaker family voltage-gated potassium channels by SRC family protein tyrosine kinases. *J Neurosci.* 22: 7913–7922.

O'Neill WC. 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol.* 276:C995-C1011.

Okada Y., Maeno E., Shimizu T., Dezaki K., Wang J. y Morishima S. 2001. Receptor-mediated control of regulatory volume decrease (RVD) and apoptotic volume decrease (AVD). *J Physiol.* 532:3-16.

Okada Y. 1997. Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl⁻ channel: fresh start to the molecular identity and volume sensor. *Am J Physiol.* 273:C755-89.

Ordaz B., Tuz K., Ochoa LD., Lezama R., Peña-Segura C. y R. Franco. 2004. Osmolytes and mechanisms involved in regulatory volume decrease under conditions of sudden or gradual osmolarity decrease. *Neurochem. Res.* 29: 65-72.

Pasantes-Morales H., Alavez S., Sánchez Olea R. Y Morán J. 1993. Contribution of organic and inorganic osmolytes to volume regulation in rat brain cells in culture. *Neurochem Res.* 18(4):445-52.

Pasantes-Morales H. y Franco R. 2002a. Influence of protein tyrosine kinases on cell volume change-induced taurine release. *Cerebellum.* 1:103-9.

Pasantes-Morales H., Franco R., Ordaz B. y Ochoa LD. 2002b. Mechanisms counteracting swelling in brain cells during hyponatremia. *Arch Med Res.* 33(3):237-44.

Pasantes-Morales H., Franco R., Torres-Marquez ME., Hernández-Fonseca K., Ortega A. 2000a Amino acid osmolytes in regulatory volume decrease and isovolumetric regulation in brain cells: contribution and mechanisms. *Cell Physiol Biochem.* 10(5-6):361-70.

Pasantes-Morales H., Lezama RA. y Ramos-Mandujano G. 2006a. Tyrosine kinases and osmolyte fluxes during hyposmotic swelling. *Acta Physiol (Oxf).* 187:93-102.

Pasantes-Morales H., Lezama RA., Ramos-Mandujano G. y Tuz KL. 2006b. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *Am J Med.* 119:S4-S11.

Pasantes-Morales H. y Morales Mulia S. 2000b. Influence of calcium on regulatory volume decrease: role of potassium channels. *Nephron.* 86:414-27.

Pasantes-Morales H., Morán J. y Sánchez-Olea R. 1992. Volume regulatory fluxes in glial and renal cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 315: 361-368.

Pasantes-Morales H., Murray RA., Lilja L. y Morán J. 1994. Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability. *Am J Physiol.* 266(1 Pt 1):C165-71.

Pasantes-Morales H., Pena Segura C., Garcia O., Morales Mulia MM., Sanchez Olea R. y Moran J. 1996. Characterization of the volume-activated taurine pathway in cultured cerebellar granule neurons. *Adv Exp Med Biol.* 403:393-400.

Pasantes-Morales H. y Schousboe A. 1988. Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector. *J Neurosci Res.* 20:503-9.

Pedersen SF., Poulsen KA. y Lambert IH. 2006. Roles of phospholipase A2 isoforms in swelling and melittin-induced arachidonic acid release and taurine efflux in NIH3T3 fibroblast. *Am. J. Physiol.* 291: C1286-C1296.

Parsons JT. Y Parsons SJ. 1997. Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways *Curr Opin Cell Biol.* 9(2):187-92.

Reinehr R., Becker S., Hongen A. y Haussinger D. 2004. The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95. *J Biol Chem.* 279: 23977-23987.

Ren XD., Kiosses WB. y Schwartz MA. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18(3):578-85.

Ridley AJ., Schwartz MA., Burridge K., Firtel RA., Ginsberg MH., Borisy G., Parsons JT. y Horwitz AR. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302(5651):1704-9.

Sanchez-Olea R. y Pasantes-Morales H. 1993. El control del volumen: una propiedad fundamental para la supervivencia de las células animales. *Ciencia.* 44:473-485.

Sanchez-Olea R., Moran J., Schousboe A. y Pasantes-Morales H. 1991. Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by difusión. *Neurosci Lett.* 13:233-236.

Sanchez-Olea R., Pena C., Moran J. y Pasantes-Morales H. 1993. Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl⁻ transport in cultured astrocytes. *Neurosci Lett.* 156:141-4

Schaller MD., Hildebrand JD., Shannon JD., Fox JW., Vines RR. y Parsons JT. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol.* 14(3):1680-8.

Schliess F., Sinning R., Fischer R., Schmalenbach C. y Häussinger D. 1996. Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. *Biochem J.* 320 (Pt 1):167-71.

Schliess F., Reissmann R., Reinehr R., vom Dahl S. y Häussinger D. 2004. Involvement of integrins and Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem.* 279(20):21294-301.

Servitja JM., Marinissen MJ., Sodhi A., Bustelo XR. y Gutkind JS. 2003. Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J Biol Chem.* 278(36):34339-46.

Shen MR., Chou CY., Browning JA., Wilkins RJ. y Ellory JC. 2001. Human cervical cancer cells use Ca²⁺ signalling, protein tyrosine phosphorylation and MAP kinase in regulatory volume decrease. *J Physiol.* 537:347-362.

Shi C., Barnes S., Coca-Prados M. y Kelly ME. 2002. Protein tyrosine kinase and protein phosphatase signalling pathways regulate volume-sensitive chloride currents in a nonpigmented ciliary epithelial cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:1525-1532.

Shuba YM., Prevarskaya N. y Lemonnier L. 2000. Volumeregulated chloride conductance in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1144-C1154.

Smith LH. y Pierce SK. 1987. Cell volume regulation by molluscan erythrocytes during hypoosmotic stress: Ca²⁺ effects on ionic and organic osmolyte effluxes. *Bio Bull.* 173:407-418.

Sobko A., Peretz A. y Attali B. 1998. Constitutive activation of delayed rectifier potassium channels by a src family tyrosine kinase in Schwann cells. *EMBO J.* 17:4723–4734.

Sorota S. 1995. Tyrosine protein kinase inhibitors prevent activation of cardiac swelling-induced chloride current. *Pflugers Arch.* 431, 178–185.

Tilly BC., van den Berghe N., Tertoolen LG., Edixhoven MJ. y de Jonge HR. 1993. Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J Biol Chem.* 268:19919-22.

Thomas SM. Y Brugge JS. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:513-609.

Vázquez-Juárez E., Ramos-Mandujano G., Lezama RA., Cruz-Rangel S., Islas LD. y Pasantes-Morales H. 2007. Thrombin increases hyposmotic taurine efflux and accelerates $I_{Cl\text{-swell}}$ and RVD in 3T3 fibroblast by a src-dependent EGFR transactivation. *Eur. J. Physiol.* 27:1-14.

Volberg T., Romer L., Zamir E. y Geiger B. 2001. pp60(c-src) and related tyrosine kinases: a role in the assembly and reorganization of matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114(Pt 2):2279-89.

Voets T., Manolopoulos V., Eggermont J., Ellory C., Droogmans G. y Nilius B. 1998. Regulation of a swelling-activated chloride current in bovine endothelium by protein tyrosine phosphorylation and G proteins. *J Physiol.* 506, 341–352.

Vom Dahl S., Schliess F., Reissmann R., Gorg B., Weiergraber O., Kocalkova M., Dombrowski F. y Haussinger D. 2003. Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver. *J Biol Chem.* 278:27088–27095.

Walsh KB. y Zhang J. 2005. Regulation of the Cardiac Volume-Sensitive Chloride Channel by Focal Adhesion Kinase and Src Kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2566–H2574.

Webb DJ., Donais K., Whitmore LA., Thomas SM., Turner CE., Parsons JT., Horwitz AF. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 6(2):154-61.

Wei H., Mei YA., Sun JT., Zhou HQ. y Zhang ZH. 2003. Regulation of swelling-activated chloride channels in embryonic chick heart cells. *Cell Res.* 13:21-28.

Wright CE., Tallan HH., Lin YY. y Gaull GE. 1986. Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem.* 55:427-53.

Xu H., Zhao H., Tian W., Yoshida K., Roullet JB. y Cohen DM. 2003. Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation. SRC family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 mediates its response to hypotonic stress. *J Biol Chem.* 278:11520-11527.