



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**PAPEL DEL GLUTATIÓN EN LA REGULACIÓN DEL
CITOESQUELETO DE ACTINA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIA

PRESENTA:
NAHUM ZEPETA FLORES

DIRECTOR DE TESIS
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR
DRA. CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.
DR. JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM,

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ABRIL DE 2019.



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.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que es mi segundo hogar.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por permitirme seguir creciendo profesionalmente.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a su Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental por permitirme la realización de esta investigación para obtener el grado de Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (Becario 231665) lo que permitió dedicarme tiempo completo a la investigación.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN214410) por el financiamiento otorgado para la realización de los experimentos desarrollados en esta investigación.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos otorgados para asistir a congresos nacionales e internacionales.

Al Dr. Emilio Rojas del Castillo por permitirme ser de su grupo de trabajo, el apoyo y asesoramiento para la realización de este proyecto.

A la Dra. María Alexandra Rodríguez Sastre por el apoyo técnico.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez y Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández por su asesoría y consejos durante cada uno de los tutorales.

A mi jurado de grado por los consejos, observaciones y correcciones realizadas durante la revisión de mi trabajo escrito y por siempre mostrarse en la mejor disposición.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS	4
INTRODUCCIÓN	
1. Glutación	5
1.1. Síntesis de glutación	5
1.2. Funciones del glutación	6
1.3. Metabolismo del glutación	7
1.4. Funciones del glutación diferentes a la antioxidante	8
2. Citoesqueleto	10
2.1. Microtúbulos	10
2.2. Filamentos intermedios	10
2.3. Microfilamentos	10
2.3.1. Proteínas de unión a actina	11
2.3.1.1. Timosina β 4	12
2.3.1.2. Profilina	12
2.3.1.3. Gelsolina	13
2.4. Citoesqueleto en la enfermedad	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	16

OBJETIVOS PARTICULARES	16
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	17
METODOLOGÍA	
▪ Modelo celular GCS-2	18
○ Cultivo celular	18
○ Análisis de expresión diferencial de genes	18
○ Análisis bioinformático DAVID	19
▪ Modelo celular MSN	20
○ Cultivo celular	20
○ Disminución del nivel de GSH intracelular mediante tratamiento con butionina sulfoximina	20
○ Viabilidad celular por la prueba dual de fluorocromos (FDA/EtBr)	20
○ Cuantificación de GSH reducido	21
○ Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno	21
○ Cuantificación de lipoperoxidación	22
○ Determinación de la expresión génica por RT-PCR	22
○ Determinación de la expresión proteica por western blot	23
○ Inmunofluorescencia	24
○ Análisis estadístico	25
RESULTADOS	
▪ Expresión de los genes del citoesqueleto de actina en células deficientes de GSH (GCS-2)	26

▪ Depleción de los niveles intracelulares de GSH	28
▪ Ausencia de estrés oxidante bajo depleción de GSH	30
▪ La depleción de GSH provoca cambios en la morfología celular	31
▪ Comparación de las formas celulares	33
▪ Niveles de expresión génica y abundancia de las proteínas de unión a actina en condiciones de depleción de GSH	36
▪ Localización celular de proteínas de unión a actina: Timosina β 4, Gelsolina y Profilina	39
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXO. ARTÍCULO: GLUTATHIONE DEPLETION TRIGGERS ACTIN CYTOSKELETON CHANGES VIA ACTIN-BINDING PROTEINS	53

RESUMEN

El tripéptido glutatión o γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina (GSH) es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos, por lo que constituye la primera línea de defensa de la célula contra el daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno. El objetivo del presente trabajo es estudiar el papel del glutatión en roles celulares alternativos a los propuestos canónicamente en un modelo incapaz de sintetizar GSH (células CGS-2) y en una línea celular derivada de un neuroblastoma (células MSN). El análisis de expresión génica en las células GCS-2 demostró que la regulación del citoesqueleto de actina es fuertemente afectada por la ausencia de GSH. Para valorar esta hipótesis, evaluamos el efecto de la depleción de GSH en células MSN, empleando el inhibidor de su síntesis, butionina sulfoximina (BSO) a una concentración de 5 y 12.5 mM. En el presente trabajo, la reducción del 70% de GSH no provocó la generación de especies reactivas de oxígeno, lipoperoxidación (Lpx) o citotoxicidad, lo cual permitió evaluar el papel del GSH en la ausencia de estrés oxidativo. Las células MSN a las cuales se les disminuyó el contenido de GSH adquirieron cambios de morfología dependientes del citoesqueleto de actina y no del citoesqueleto de tubulina.

Se evaluó la expresión de tres proteínas de unión a actina: timosina β 4, profilina y gelsolina, encontrándose una expresión disminuida, tanto génica como proteica a las 24 horas de la administración de butionina sulfoximina, sin embargo, esta disminución desaparece en las 48 horas de tratamiento. Estos cambios fueron suficientes para relocalizar estas proteínas hacia las proyecciones citoplasmáticas.

Nuestros datos confirman que una disminución en el contenido de GSH, en ausencia de estrés oxidativo pueden transitoriamente inhibir las proteínas de unión a actina y que este estímulo es suficiente para inducir cambios en la morfología celular a través del citoesqueleto de actina.

ABSTRACT

The importance of glutathione in alternative cellular roles to the canonically proposed, were analyzed in a model unable to synthesize GSH. Gene expression analysis shows that the regulation of the actin cytoskeleton pathway is strongly impacted by the absence of GSH. To test this hypothesis, we evaluate the effect of GSH depletion via buthionine sulfoximine (5 and 12.5 mM) in human neuroblastoma MSN cells. In the present study, 70% of GSH reduction didn't induce reactive oxygen species, lipoperoxidation or cytotoxicity, which enabled us to evaluate the effect of glutathione in the absence of oxidative stress. The cells decreasing GSH levels acquired morphology changes depended on the actin cytoskeleton and not on tubulin.

We evaluated the expression of three actin-binding proteins: thymosin β 4, profilin and gelsolin, showing a reduced expression both at gene and protein levels at 24 h of treatment; however, this suppression disappears after 48 h of treatment. These changes were sufficient to trigger the co-localization of the three proteins toward cytoplasmic projections. Our data confirm that a decrease in GSH in the absence of oxidative stress can transiently inhibit the actin binding protein and that this stimulus is sufficient to induce changes in cellular morphology through actin cytoskeleton.

ABREVIATURAS

GSH	Glutación
γ-GCS	γ -glutamilcisteina sintetasa
GCL	Glutamato cisteína ligasa, anteriormente conocida como γ -glutamilcisteina sintetasa (γ -GCS)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Lpx	Lipoperoxidación
GPx	Glutación peroxidasa
GSSG	Glutación disulfuro
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación S-transferasa
γ-GT	γ -glutamil transpeptidasa
GS	Glutación sintetasa
NAC	N-acetilcisteína
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
SFB	Suero Fetal Bovino
BSO	Butionina sulfolimina

INDICE DE FIGURAS, GRAFICOS Y TABLAS

Figura 1. Síntesis de glutatión	6
Figura 2. Metabolismo del glutatión	8
Figura 3. Modelo de la dinámica de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina, donde se representa la función de las proteínas de unión a actina	13
Figura 4. Estrategia Experimental	17
Figura 5. Comparativa de los cambios morfológicos inducidos por los tratamientos de BSO por 24 y 48 horas	35
Figura 6. Cuadro comparativo de las formas predominantes en 25 células MSN control y tratadas con BSO	36
Figura 7. Distribución celular de las proteínas de unión a actina Gelsolina, Profilina y Timosina β 4	41
Gráfico 1. La disminución de los niveles de GSH intracelular genera efectos sobre la viabilidad celular	29
Gráfico 2. Efecto del tratamiento de BSO en la expresión génica en células MSN	37
Gráfico 3. Efecto del tratamiento de BSO en la expresión proteica en células MSN	38
Tabla 1. Análisis de las funciones moleculares alteradas por la falta de GSH en células embrionarias de ratón GCS-2. Análisis bioinformático DAVID	26
Tabla 2. Análisis de la expresión génica implicada en la ruta del citoesqueleto de actina en células embrionarias de ratón GCS-2. Análisis bioinformático DAVID	27
Tabla 3. Ausencia de estrés oxidativo bajo depleción de GSH	30
Tabla 4. Análisis multivariado de marcadores de estrés oxidante con la viabilidad celular	31

INTRODUCCION

1. Glutación

El glutación (GSH) fue descubierto en 1888 por Rey Pailhade y fue llamado "philothione", posteriormente en los 20's fue descrito por Sir Frederick Gowland Hopkins, en la década de los 30's su estructura fue resuelta y más tarde, en la década de los 70's fue redescubierto y se reconoció como el tiol no proteico más importante de la célula (Cotgreave and Gerdes, 1998; Aoyama et al., 2008). El glutación o usualmente abreviado GSH, es un tripéptido formado por los aminoácidos L-glutamato, L-cisteína y glicina, por lo que su nombre químico es: γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina (Bains et al., 1997).

1.1. Síntesis del glutación

La síntesis del glutación (GSH) se lleva a cabo por la acción consecutiva de dos enzimas: la γ -glutamylcisteina sintetasa (γ -GCS) o también denominada glutamato cisteína ligasa (GCL), usa glutamato y cisteína como sustratos para formar el dipéptido γ -L-glutamyl-L-cisteinil, el cual es combinado con glicina en una reacción catalizada por la enzima glutación sintetasa para formar al GSH. Cabe mencionar que ambas enzimas emplean adenosina trifosfato (ATP) como cosustrato, y que la γ -GCS es la enzima limitante en la síntesis de GSH. El nivel intracelular de GSH es regulado por la inhibición de la enzima γ -GCS por el producto final de la reacción, el GSH. Por lo tanto, la síntesis y el consumo de GSH están en balance (Dringen, 2000).

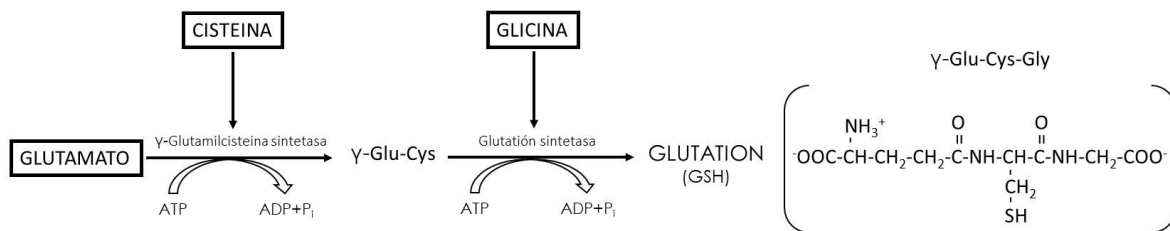


Figura 1. Síntesis de glutatión.

1.2. Funciones del glutatión

El GSH es un tiol celular que se encuentra presente en altas concentraciones (hasta 12mM) en las células de los mamíferos. Tiene funciones importantes como antioxidante, participa en reacciones de desintoxicación de xenobióticos, es cofactor en reacciones de isomerización y sirve como almacén y transporte de cisteína (Meister and Anderson, 1983). Además, el GSH es esencial para la proliferación celular y mantiene el potencial redox de los tioles en las células, conservando los grupos sulfhídrico de las proteínas en su forma reducida (Cotgreave and Gerdes, 1998). También existe evidencia que el glutatión participa en la regulación de la apoptosis (Franco and Cidlowski, 2009). Es cofactor de varias enzimas desintoxicantes, como la GSH peroxidasa y transferasa y participa en la conversión de las vitaminas C y E a sus formas activas (Briden et al. 2012). El sistema del GSH es muy importante ya que defiende a la célula contra las especies reactivas de oxígeno (ERO). El GSH, gracias al grupo sulfhídrico de la cisteína (-SH), tiene la capacidad de reaccionar directamente con radicales en reacciones no enzimáticas, por lo que constituye la primera línea de defensa de la célula contra el daño oxidativo causado por las ERO. También puede formar conjugados con xenobióticos y participa en la reducción de peróxidos.

1.3. Metabolismo del glutatión

Durante la desintoxicación de las ERO, el GSH participa en dos tipos de reacción:

1. El GSH reacciona de manera no enzimática con radicales como el radical anión superóxido, óxido nítrico o el radical hidroxilo.
2. El GSH participa como donador de electrones para la reducción de peróxidos en la reacción catalizada por la enzima Glutatión peroxidasa (GPx).

El producto final de la oxidación de GSH es el glutatión disulfuro (GSSG). El GSH es regenerado desde el GSSG dentro de las células por la reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa (GR). El producto de la GPx es GSSG, el cual es convertido a GSH por acción de la enzima GR.

Durante las reacciones catalizadas por la GPx y la GR, el GSH no es consumido, es reciclado, sin embargo, durante la generación de conjugados por acción de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) y durante la liberación de GSH al espacio extracelular, el GSH es consumido, lo cual se ve reflejado en el nivel intracelular de GSH. A pesar de que el GSH es consumido, este es re-sintetizado a partir de los aminoácidos que lo constituyen. El GSH puede ser excretado a los espacios extracelulares en sus tres formas: GSH, GSSG y conjugados de GSH, los conjugados son hidrolizados en sus diferentes componentes y son reabsorbidos, sin embargo, los residuos de cisteína generalmente permanecen conjugados con xenobióticos y son liberados por los organismos en las heces. La mayoría de los conjugados de GSH se metabolizan a conjugados de N-acetil cisteína (ácidos mercapturicos) correspondientes y se liberan en la orina y la bilis. Los residuos de glutamato y glicina generalmente se recuperan, pero los residuos de cisteína permanecen conjugados y se pierden (Volodymyr 2012). El GSH extracelular y sus conjugados son substratos de la ectoenzima γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GT), la cual cataliza la transferencia del grupo γ -glutamyl del GSH o del conjugado a una molécula aceptor, generando así el dipéptido Cisteína-Glicina (γ -CysGly). Este

dipéptido puede ser hidrolizado por las ectopeptidasa a cisteína y glicina, aminoácidos que posteriormente serán reabsorbidos por las células y servirán como sustratos para la síntesis de *ново* de GSH (Lieberman et al., 1996).

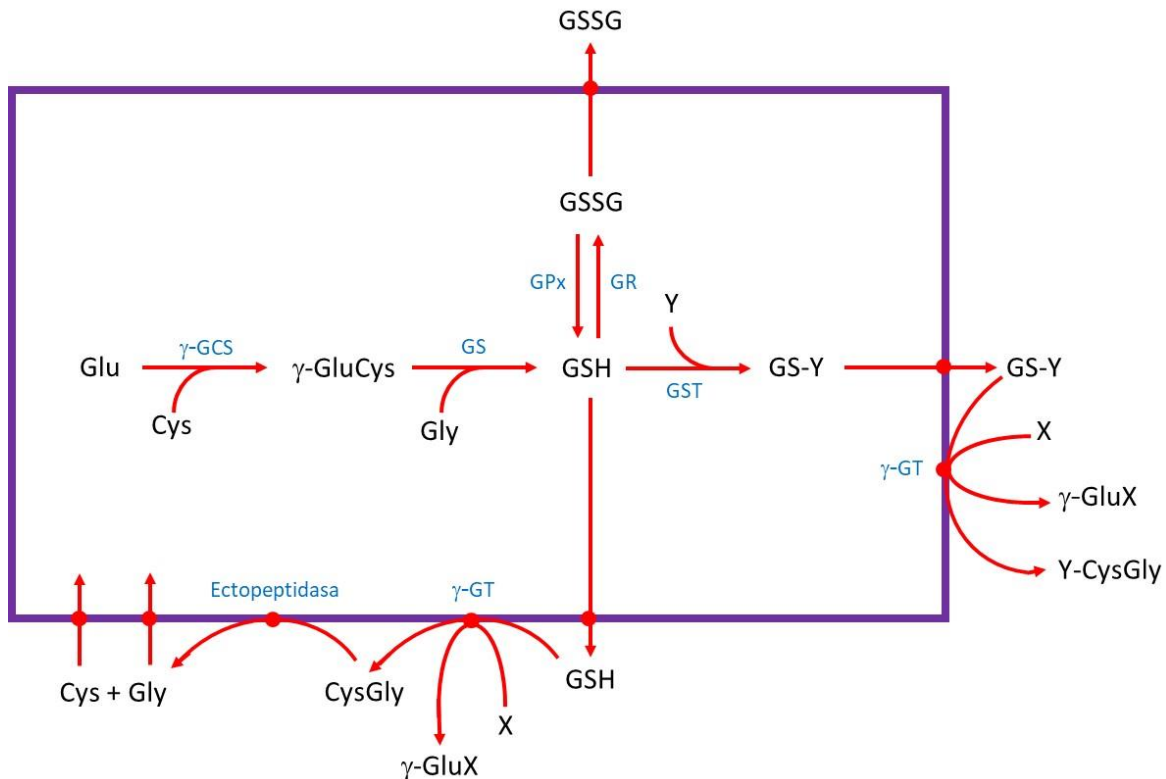


Figura 2. Metabolismo del Glutatión. X: aceptor del γ -glutamil proveniente del GSH, Y: sustrato de la GST, GSH: Glutatión, γ -GCS: γ -glutamilcisteína sintetasa, GPx: Glutatión peroxidasa, GSSG: Glutatión disulfuro, GR: Glutatión reductasa, GST: Glutatión S-transferasa, γ -GT: γ -glutamil transpeptidasa, GS: Glutatión sintetasa (modificado de Drigen, 2000).

1.4. Funciones del glutatión diferentes a la antioxidante

Existen un gran número de estudios sobre el metabolismo del GSH, pero poco se sabe si el GSH tiene funciones diferentes a la antioxidante. De los primeros estudios que evidencian que el GSH puede tener otras funciones distintas a la de un antioxidante es el de Lieberman y colaboradores (1996), donde muestran que la disminución del contenido de GSH intracelular provocada por la deficiencia de la

enzima γ -GT en ratones tiene efectos como anomalías esqueléticas, crecimiento lento, muerte prematura y la pérdida del color del pelaje. La administración del antioxidante N-acetil cisteína (NAC) a estos ratones les permite un desarrollo casi normal, pero características como el color del pelaje no son totalmente reestablecidas, lo que sugiere que el GSH tiene funciones diferentes a la de ser simplemente un antioxidante (Lieberman et al., 1996; Levasseur et al., 2003).

Más tarde, con el propósito de ahondar en el estudio de las funciones del GSH, Shi y colaboradores en el 2000 generaron un ratón knockout para la enzima GCL y por lo tanto incapaz de sintetizar GSH. Los embriones knockout no gastrulan, no forman el mesodermo y finalmente mueren por apoptosis antes del día 8.5. De estos embriones se aisló la línea celular knockout de la GCL denominada GCS-2 mediante el cultivo en medio adicionado con GSH, aunque también pueden crecer indefinidamente en medio suplementado con NAC y con niveles indetectables de GSH. Estos datos sugieren que el GSH es necesario para el desarrollo de los mamíferos, pero no para el crecimiento celular, ya que los embriones no pudieron ser rescatados con NAC como se hizo con las células, debido a que el NAC solo puede suplir las funciones del GSH como antioxidante y ser fuente de cisteína, pero no aquellas que dependen de la molécula “per se” y que aún resultan desconocidas (Shi et al., 2000).

En otro contexto, en el proceso de apoptosis, estudios iniciales sugerían que la disminución del GSH era una consecuencia del estrés oxidativo generado durante la muerte celular, sin embargo, estudios recientes sugieren que la disminución del GSH y la modificación de proteínas a través de la glutationilación son reguladores críticos de la apoptosis (Franco and Cidlowski, 2009).

2. Citoesqueleto

El citoesqueleto es un entramado tridimensional de filamentos que provee el soporte interno en las células, está conformado por cientos de proteínas que forman redes filamentosas que se extienden desde la membrana plasmática hasta la envoltura nuclear e interconecta el núcleo celular con la matriz extracelular, por lo que se ve involucrado en todos los aspectos estructurales y dinámicos de la célula, organiza las estructuras internas e interviene en los fenómenos de transporte, tráfico y división celular (Ramaekers y Bosman, 2004). Estas redes filamentosas son de tres tipos: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, todos ellos polímeros contruidos por subunidades proteicas que se unen no-covalentemente (Lodish et al., 2008).

2.1. Microtúbulos

Los microtúbulos están contruidos de protofilamentos, lo cuales son el resultado de la polimerización de heterodímeros de α y β tubulina. La mayoría de los microtúbulos están contruidos por 13 protofilamentos que interactúan para formar una estructura tubular (Wickstead and Gull, 2011).

2.2. Filamentos intermedios

Los filamentos intermedios son diferentes a los microtúbulos en estructura, bioquímica y distribución filogenética. Son formados por dímeros de proteínas que se superponen para formar filamentos no polarizados (Wickstead and Gull, 2011).

2.3. Microfilamentos

La actina es una proteína globular llamada G-actina, la cual es ubicua y forma filamentos, F-actina. Los filamentos de actina, también llamados microfilamentos,

están formados por dos protofilamentos, lo cuales están enrollados entre sí, formando una doble hélice a la derecha (Wickstead and Gull, 2011). Estos filamentos de actina son altamente dinámicos, lo que permite a la célula responder a señales extracelulares mediante el movimiento, cambio de forma o mediante la translocación de organelos (Chen et al., 2000).

Aunque la polimerización de la actina *in vivo* no requiere factores como proteínas accesorias, la dinámica del citoesqueleto de actina está altamente regulada por proteínas accesorias que hacen que la dinámica de polimerización y despolimerización sea unas 100 a 200 veces más rápida (Lodish et al., 2008).

2.3.1. Proteínas de unión actina

Todos los eventos móviles de una célula no-muscular involucran la reorganización de los filamentos de actina, dicha reorganización siempre está acompañada de la acción de proteínas accesorias, llamadas proteínas de unión actina, que regulan la polimerización y despolimerización de la actina a través de distintas actividades. Algunas proteínas secuestran monómeros de actina para prevenir la formación espontánea de filamentos (timosina β 4), otras interactúan con monómeros de actina para facilitar el intercambio de nucleótidos de ATP (profilina), otras rompen los filamentos de actina para generar nuevos filamentos o para desensamblar los ya formados (ADF/Cofilina y gelsolina), otras se unen a los extremos crecientes de los filamentos para evitar su elongación (proteínas cap, gelsolina y el complejo Arp2/3) y otras sirven de núcleo para iniciar la polimerización de nuevos filamentos (complejo Arp2/3). Aunque existe un gran número de proteínas de unión a actina, las proteínas antes mencionadas, timosina β 4, gelsolina, profilina, ADF/Cofilina y el complejo Arp2/3 son ubicuas en células eucariontes además de que con ellas se cubren las funciones necesarias para regulación del citoesqueleto de actina (Chen et al., 2000).

2.3.1.1. Timosina β 4

La proteína citosólica timosina β 4 tiene una alta afinidad por ATP-G-actina, por lo que es considerada la principal secuestradora de monómeros de actina; esta proteína forma un complejo 1:1 con la actina lo que impide su polimerización, sin embargo, se encuentra en equilibrio con la concentración de F-actina:



Por lo anterior, la concentración de filamentos de actina es sensible a cambios en la concentración de timosina β 4 en el citosol (Lodish et al., 2008), lo cual repercutirá en la dinámica del citoesqueleto de actina.

La proteína timosina β 4, además de ser una proteína secuestradora de G-actina, se le ha involucrado en procesos como apoptosis, angiogénesis, carcinogénesis, inflamación y cicatrización, por otro lado, dada su abundante expresión en el cerebro y que el citoesqueleto de actina juega un papel de suma importancia en la sinaptogénesis y en la plasticidad sináptica, la proteína timosina β 4 tiene un rol importante en el sistema nervioso central (Ying et al., 2004; Popoli et al., 2007).

2.3.1.2. Profilina

Profilina es una proteína citosólica que tiene la capacidad de secuestrar monómeros de ATP-actina de manera estable, formando un complejo 1:1; a diferencia de la proteína timosina β 4, profilina solo puede formar complejo con alrededor del 20% de la actina no polimerizada. Aunque esta proteína también secuestra actina, se le ha atribuido la función de promover la polimerización de actina, ya que el análisis de la estructura tridimensional del complejo profilina-actina sugiere que se puede unir transitoriamente al extremo creciente del filamento de

actina, acercando el monómero de actina para que polimerice y crezca el filamento, además facilita el intercambio de ADP por ATP (Wang et al., 2003).

2.3.1.3. Gelsolina

Es una proteína de unión a actina, perteneciente al grupo denominado separadoras o fragmentadoras de filamentos de actina, esta se une a los laterales de los filamentos de actina y los rompe, para favorecer la despolimerización de los filamentos en áreas donde ya no son requeridos y ser reutilizados en otras áreas (Lodish et al., 2008). Principalmente se encuentra en el citosol, aunque también existe una forma que es excretada al plasma (Qiao et al., 2005).

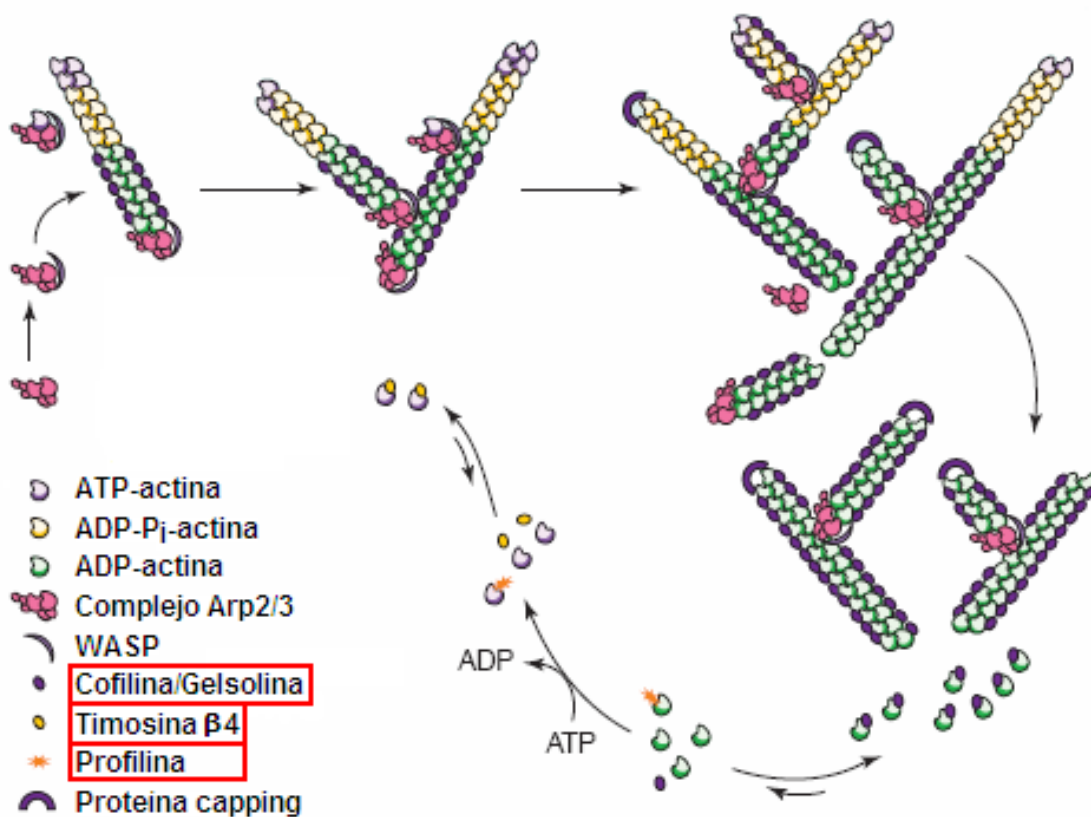


Figura 3. Modelo de la dinámica de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina, donde se representa la función de las proteínas de unión a actina.

2.4. Citoesqueleto en la enfermedad

Dado que el citoesqueleto está involucrado en la gran mayoría de los procesos celulares, anomalías en él, generalmente resultan en condiciones patológicas, evidenciando que esta estructura es crucial para la célula. De hecho, se han asociado anomalías en el citoesqueleto con algunas enfermedades tales como enfermedades cardiovasculares, en el proceso de invasión en cáncer, cirrosis hepática, fibrosis pulmonar y sobre todo neurodegeneraciones (Ramaekers y Bosman, 2004). Algunas neurodegeneraciones se caracterizan por la presencia de agregados de proteínas anormales en neuronas y glía del sistema nervioso central, que incluso han permitido la clasificación molecular de algunas de la gran variedad de neurodegeneraciones, relacionándolas con la presencia de agregados de filamentos intermedios neuronales o de la proteína asociada a microtúbulos tau, ya que aparentemente comparten mecanismos patológicos comunes. Estos desórdenes han sido llamados filamentopatías y tauopatías, respectivamente, destacando en el primer desorden la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, neuropatía diabética y enfermedad de Parkinson, y en el segundo la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración corticobasal, síndrome de Down, demencia frontotemporal, distrofia miotónica, enfermedad de Pick, entre otras. Estudios también sugieren que el citoesqueleto de actina, en particular proteínas de unión a actina, también pueden tener implicaciones en algunas neurodegeneraciones (Cairns et al., 2004).

HIPÓTESIS

Cambios en el nivel de glutatión intracelular modificaran la expresión génica y proteica de gelsolina, profilina y timosina β 4 causando alteraciones en la dinámica del citoesqueleto de actina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el glutatión juega un papel en la regulación del citoesqueleto de actina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si el glutatión juega un papel en la regulación del citoesqueleto de actina en la línea celular GCS-2 (incapaz de sintetizar glutatión).
- Determinar el efecto de la inhibición farmacológica de la síntesis de glutatión en la línea celular MSN sobre la regulación del citoesqueleto de actina.
- Evaluar si la disminución del nivel intracelular de glutatión tiene efectos sobre la viabilidad celular.
- Disminuir el nivel intracelular de glutatión en la línea celular MSN.
- Evaluar si existe generación de estrés oxidativo tras la disminución del nivel intracelular de glutatión.
- Evaluar si hay cambios en la expresión génica y proteica de actina, timosina β 4, gelsolina y profilina tras la disminución de glutatión intracelular.
- Evidenciar si la disminución de glutatión tiene efectos sobre la dinámica del citoesqueleto de actina.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

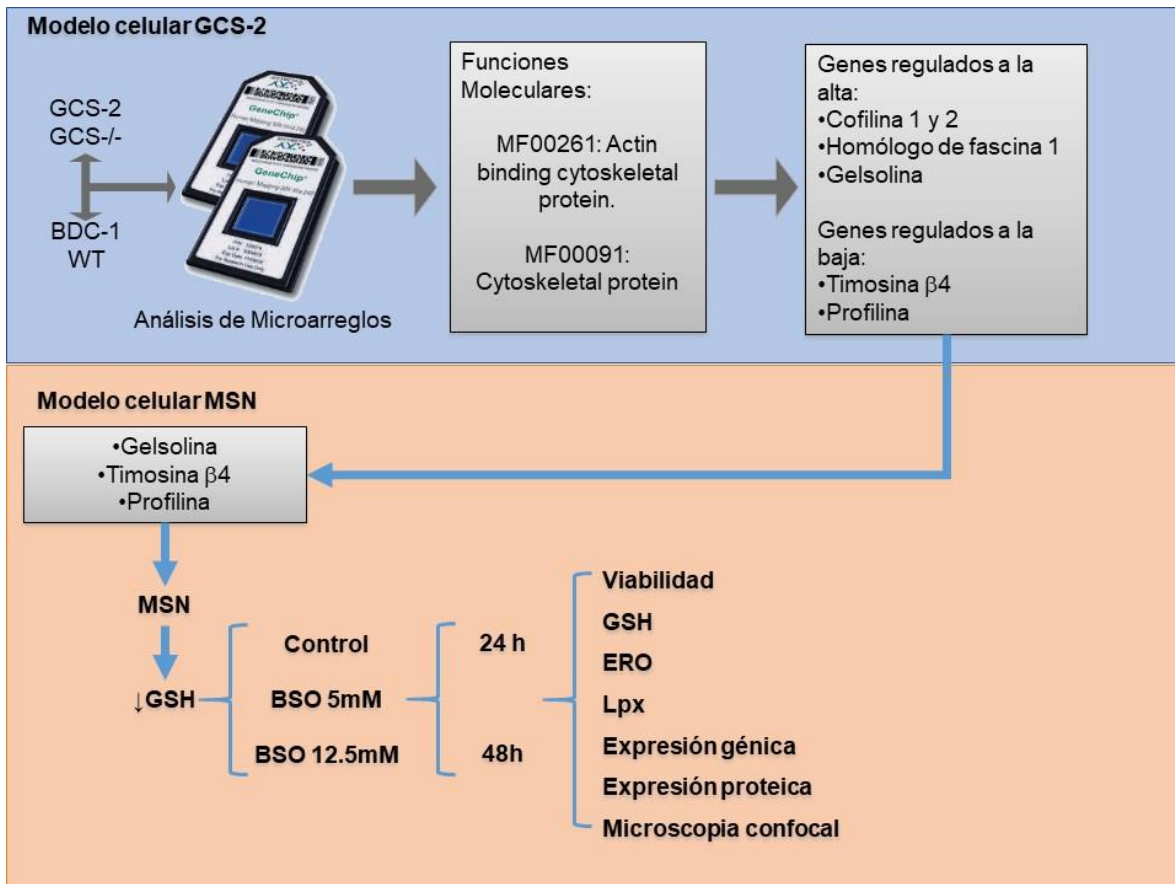


Figura 4. Estrategia Experimental. Modelo celular GCS-2. Para el análisis de microarreglos se empleó la línea celular GCS-2, incapaz de sintetizar glutatión dado que es knockout para la enzima glutamato cisteína sintetasa, obtenida a partir de ratones GCS $-/-$. Las células control se obtuvieron a partir de ratones BDC1 (*wild type*). Los resultados del análisis de microarreglos mostraron que la vía del citoesqueleto de actina es fuertemente afectada por la ausencia de GSH. **Modelo celular MSN.** La línea celular MSN proviene de un neuroblastoma humano, en dicha línea se disminuyó el contenido intracelular mediante tratamientos con BSO. Se evaluó la viabilidad celular, el contenido intracelular de glutatión, especies reactivas de oxígeno y lipoperoxidación para corroborar que la disminución del contenido de glutatión es compatible con la viabilidad celular y no genera un estado de estrés oxidante. Mediante microscopia confocal se evaluó la morfología de las células. Posteriormente se evaluó la expresión génica y proteica de gelsolina, profilina y timosina β 4. Finalmente, mediante microscopia confocal se evaluó la distribución de las proteínas de gelsolina, profilina y timosina β 4.

METODOLOGIA

Modelo celular GCS-2

Cultivo celular

Se obtuvieron blastocistos de ratón a partir de ratones deficientes de la enzima γ GCS (GCS^{-/-}) y por lo tanto incapaces de sintetizar glutatión, los cuales se denominaron como GCS-2. Como células control se emplearon blastocistos obtenidos de ratones BDC1 (*wild type*). Los ensayos se llevaron a cabo usando medio completo M15, DMEM *knockout* suplementado con 15% de suero fetal bovino (SFB) certificado para células madre embrionarias, 2 mM de glutamina, 0.1 mM β -mercaptoetanol, 100 unidades/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina. Las células GCS-2 se mantuvieron en medio suplementado con 2.5 mM de GSH, cambiando el medio todos los días. En los experimentos donde se retiró el suplemento de GSH, las células se lavaron dos veces con PBS 1x y se colocó medio fresco sin suplementar con GSH. Las células se incubaron a 37°C en incubadora con CO₂ al 5%. Se cuantificaron los niveles de GSH en células con medio suplementado o sin suplementar con GSH. La viabilidad y cuantificación de células se determinó usando tinción de exclusión con azul tripano (Zheng-Zheng et al., 2000).

Análisis de expresión diferencial de genes

Para hacer el análisis de la expresión diferencial de genes se aisló el ARN total por medio de trizol y purificándolo posteriormente por medio del kit de aislamiento de RNA total RNeasy. Se llevo a cabo la síntesis de cARN de doble cadena mediante el sistema Super Script Choice. El cARN obtenido se purifico mediante extracciones fenol-cloroformo. Mediante el kit Bioarray Highyield RNA se marcó el cARN con biotina. Los productos de la transcripción in vitro fueron purificados usando columnas de centrifugación RNeasy y cuantificados por análisis

espectrofotométrico. Después de la purificación, el cARN se fragmento usando el procedimiento estándar de Affymetrix para obtener fragmentos de ARN de aproximadamente 35-200 bases. La integridad del ARN fragmentado se verifico por medio de electroforesis en gel de agarosa.

A partir del cARN fragmentado se preparó un coctel de hibridación mezclando 0.05 µg/µL de cARN fragmentado; 50 pM del control oligonucleótido B2; 1.5, 5, 25 y 100 pM de controles eucarióticos de hibridación con genes bioB, bioC, bioD y cre respectivamente; 0.1 mg/mL de ADN de esperma de arenque; 0.5 mg/mL de BSA acetilada y 1x de buffer de hibridación. El coctel se calentó a 99°C por 5 minutos y posteriormente se colocó el cartucho. La hibridación se realizó durante 16 h con rotación a 60 rpm en un horno a 45°C. Después de la hibridación, se retiró el coctel de la matriz de la sonda y se llenó con el buffer de lavado. La estación GeneChip fluidics station 400 se utilizó para lavar y teñir los microarreglos. Se siguió el protocolo de tinción del fabricante. Los microarreglos fueron lavados dos veces y teñidos con 10 µg/L de solución de ficoeritrina estreptavidina. Después de la tinción se realizó un lavado final con buffer de lavado y se escanearon los microarreglos.

Análisis bioinformático DAVID

Los recursos de bioinformática de DAVID consisten en una base de conocimientos biológicos integrados y herramientas analíticas destinadas a extraer sistemáticamente el significado biológico de grandes listas de genes o proteínas. Es un entorno de minería de datos integrado y de alto rendimiento para analizar listas de genes derivadas de experimentos genómicos de alto rendimiento (Huang et al., 2009).

Modelo celular MSN

Cultivo celular

La línea celular MSN proviene de un neuroblastoma humano (Reynolds et al., 1986), son células adherentes, que crecen en monocapa. Se cultivaron en cajas de cultivo utilizando medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina-estreptomicina-anfotericina) y 1% de QSN (glutamina-serina-asparagina). Para llevar a cabo los experimentos, las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Las células fueron sub-cultivadas a una densidad de 1x10⁶ células por caja de cultivo y cosechadas por pipeteo.

Disminución del nivel de GSH intracelular mediante tratamiento con butionina sufolximina

Se sembraron 1X10⁶ células MSN en placas de cultivo de 100 mm con 7 mL de medio RPMI 1640 suplementado. Después de 72 horas, las células en cultivo se lavaron cuidadosamente con PBS 1x estéril y se adicionaron 10 mL de medio RPMI 1640 suplementado. Los tratamientos con butionina sufolximina (BSO) se administraron en concentraciones finales de 0, 5, 12.5, 25 y 50 mM. Las células fueron tratadas por 24 y 48 horas.

Viabilidad celular por la prueba dual de fluorocromos (FDA/EtBr)

La viabilidad celular se midió usando el método de doble tinción usando diacetato de fluoresceína (FDA)/bromuro de etidio (BrEt). Por cada muestra, se tomaron 10 µL de suspensión celular y fueron mezcladas con 10 µL de la solución de fluorocromos que contenía 0,02 µg/ml de Et-Br y 0,015 µg/ml de FDA (Sigma-Aldrich). Las células se analizaron usando un microscopio de fluorescencia Olympus

BX-60 con un filtro UM61002 (Olympus, Tokio, Japón). El análisis en el microscopio de fluorescencia permite diferenciar las células vivas (verdes) de las células muertas (rojo). Realizando un conteo aleatorio de 100 células por muestra se determinó un porcentaje de viabilidad.

Cuantificación de GSH reducido

Para cuantificar el nivel de glutatión reducido se empleó el agente derivatizante orto-ftalaldehído (OPT), debido a que forma un aducto fluorescente con el GSH, pero no con el GSSG. Se tomó una alícuota de 100 μ L de suspensión celular en PBS e inhibidores y se adicionó 100 μ L de ácido meta-fosfórico, agente precipitante (1.67 g de ácido meta-fosfórico, 0.2 g de EDTA y 30 g de NaCl en 100 mL de agua destilada), colocándolos en un tubo eppendorf de 600 μ L, se agitaron en vortex y centrifugaron para recolectar el sobrenadante, el cual se congeló a -70°C para posteriormente cuantificar GSH. Para cuantificar GSH se tomaron 50 μ L de sobrenadante, se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL, adicionando 1 mL de buffer de GSH (0.1M NaH_2PO_4 y 0.005M de EDTA a pH 8). Posteriormente se adicionó 50 μ L de OPT (1 mg/mL en metanol) para obtener un conjugado fluorescente de GSH. Se tomaron 200 μ L de la mezcla y se colocaron en una placa opaca de 96 pozos, la cual se incubó durante 15 minutos en oscuridad. La fluorescencia se leyó en un lector de microplacas de fluorescencia BioTek FLx800 con la emisión ajustada a 420 nm y la excitación ajustada a 350 nm.

Determinación de Especies Reactivas de Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se determinaron con un ensayo flurométrico modificado, usando dihidrorodamina 123 como sonda. El principio de este método está basado en la oxidación de la dihidrorodamina 123 dependiente de la cantidad de ERO, para formar el compuesto fluorescente de rodamina 123. A partir de una alícuota de 100 μ L de suspensión celular en PBS e inhibidores, se

centrifuga a 12,000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 180 μ L de buffer A (140 mM de NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 1.8 mM de $CaCl_2$, 5 mM de glucosa, 15 mM de HEPES) y 20 μ L de dihidrorodamina. Las muestras se incubaron por dos minutos a 37°C. El producto fluorescente de rodamina 123 se midió usando un espectrofotómetro a 505 nm e interpolando a partir de una curva estándar de rodamina 123.

Cuantificación de lipoperoxidación

Para medir la concentración de malondialdehído (MDA) se empleó el método del ácido tiobarbitúrico. Se tomó una alícuota de 100 μ L de células suspendidas en PBS e inhibidores de proteasas y se añadieron 100 μ L de ácido tricloroacético (10% p/v) y se centrifugó a 3,000 g por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se le adicionó 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0.375%) y la mezcla se calentó a 92°C durante 45 minutos. La absorbancia del complejo ácido tiobarbitúrico-MDA se midió a 532 nm usando un espectrofotómetro ELISA. Los datos se interpolaron en una curva de concentración de MDA (1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano) de 0 a 10 nM.

Determinación de la expresión génica por RT-PCR

El ARN total se aisló usando el reactivo trizol siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La cantidad y pureza del ARN se determinó espectrofotométricamente. Para la reacción de RT-PCR (del inglés *Reverse transcription-polymerase chain reaction*) se empleó el sistema Access RT-PCR, siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega). Los productos de RT-PCR se cargaron en un gel de agarosa al 3% y los niveles de mRNA se analizaron usando el software Kodak 1D v3.5.3. Se utilizaron los siguientes primers:

Actina: catcatgaagtgtgacgtgg (forward), atactcctgcttgctgatcc (reverse).

Thymosin β 4: tgaacaggagaagcaagcag(forward), tagacagatgggaaaggcag (reverse).

Gelsolin: acggctgaaggacaagaaga (forward), ttccaacccagacaaagacc (reverse).

Profilin: ggaggcggattgaataagaag (forward), ccatcacctgcattgctaa (reverse).

Ribosomal Protein L32: aagaagttcatccggcaccag (forward), gcgatctcggcacagtaagat (reverse).

Se empleó la proteína ribosomal L32 como control.

Determinación de la expresión proteica por western blot

Las células MSN se lisaron en buffer RIPA (150 mM de NaCl, 0.1% de Tritón X-100, 0.5% de desoxicolato de sodio, 0.1% de dodecilsulfato de sodio y 50 mM de Tris-HCL, pH 8) con inhibidores de proteasas y se centrifugaron. Las proteínas totales se cuantificaron usando el kit de ácido bicinonínico (Thermo-Fisher Scientific Inc.). Se tomaron cantidades iguales de proteínas y se cargaron en geles de poliacrilamida, se llevó a cabo la electroforesis para poder separar las proteínas. Terminada la electroforesis se llevó a cabo la transferencia en membranas de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno, la primera se empleó para detectar proteínas con peso molecular superior a 20 kDa, mientras que la segunda se empleó para proteínas por debajo de 20 kDa. La membrana se bloqueó con leche descremada al 5% y albumina al 1% en TBS y luego se incubó secuencialmente con anticuerpo primario y posteriormente con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano. Los anticuerpos primarios empleados fueron anti-Timosina β 4 policlonal de cabra (1:2000), anti-Gelsolina monoclonal de ratón (1:2000), anti-Profilina 1/2 policlonal de conejo (1:2000) y anti- β tubulina monoclonal de ratón (1:2000). Los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo y se incubaron con las membranas a 37°C durante 1 hora. Posteriormente las membranas se lavaron con TBS-Tween 20 al 0.1% y se incubaron con anticuerpo secundario, de la misma manera que el anticuerpo primario. Las bandas se visualizaron usando los reactivos de detección Amersham ECL de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Una

vez obtenidas las bandas se analizaron por medio de densitometría, para así poder cuantificar la cantidad de proteína presente en cada una de las muestras

Inmunofluorescencia

Se sembraron un total de 10^5 células MSN en cubreobjetos recubiertos con gelatina al 0.1% en una placa de 12 pozos y se incubaron durante 72 horas o hasta que estuvieran subconfluentes. Posteriormente se lavaron las laminillas con PBS 1x, se renovó el medio y se adicionaron los tratamientos de BSO a una concentración de 5 y 12.5 mM. Después de 24 o 48 horas de tratamiento con BSO, se eliminaron los medios y las células MNS se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron las células con PBS-Tritón X-100 al 0.2%. Previo a la incubación con anticuerpos, las muestras se bloquearon con albumina al 1% y SFB al 5% en PBS. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti- β -tubulina monoclonal de ratón (1:50), anti-Timosina β 4 policlonal de cabra (1:50), anti-Gelsolina monoclonal de ratón (1:50) y anti-Profilina 1/2 policlonal de conejo (1:50). Los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Transcurrida la incubación, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS-Tritón X-100 al 0.2% durante 5 minutos. Los anticuerpos secundarios empleados fueron: anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con FITC (1: 100), anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con FITC (1: 100) y anticuerpo bovino anti-cabra marcado con FITC (1:100). También se empleó Faloidina marcada con Alexa Flour 594 (1:50) para teñir los filamentos de actina y 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), 300nM, para contrastar los núcleos de la célula. Todos los anticuerpos secundarios se disolvieron en solución de bloqueo. Las células se incubaron con los anticuerpos secundarios y con Faloidina Alexa Flour 594 a 37°C durante 1 hora. Se añadió DAPI durante los últimos 5 minutos de incubación del anticuerpo secundario. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS-Tritón X-100 al 0.2% y se montaron en portaobjetos empleando el medio de montaje Dako (Dako North America, Inc.) para su posterior análisis. Las muestras fueron examinadas en un microscopio invertido Axio Observer acoplado a un microscopio de escaneo laser confocal LSM

710 DUO (Carl Zeiss), empleando un objetivo sumergido en aceite Plan Achromat 40X/1.3. Las imágenes fueron capturadas empleando el software ZEN 2008 (Carl Zeiss) y analizadas empleando el paquete Fiji para el procesamiento de imágenes de ImageJ.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como porcentaje de error estándar (EE). La significancia estadística se analizó utilizando ANOVA de una vía, la prueba t-Student y los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron utilizando el software SigmaStat y los histogramas se realizaron utilizando el software SigmaPlot. Se realizó también una regresión lineal con el software SigmaStat para determinar si los tratamientos con BSO estaban relacionados con los cambios en la viabilidad celular, los niveles de ROS y la lipoperoxidación.

RESULTADOS

Expresión de los genes del citoesqueleto de actina en células deficientes de GSH (GCS-2)

En la Tabla 1 se observa el análisis global de las funciones moleculares en células incapaces de sintetizar GSH, obtenido por los patrones de expresión génica y el número de genes implicados con sus respectivos valores de *p*.

El análisis de expresión mostró que la vía del citoesqueleto de actina se observa fuertemente afectada por la ausencia de GSH y que las proteínas de unión a actina tales como cofilina 1 y 2, homólogo de fascina y Gelsolina se encontraron sobre expresadas, mientras que proteínas como Timosina β 4 y Profilina se encontraron sub expresadas, datos mostrados en la Tabla 2.

Tabla 1. Análisis de las funciones moleculares alteradas por la falta de GSH en células embrionarias de ratón GCS-2. Análisis bioinformático DAVID.

Término	Conteo	%	Valor de <i>p</i>	Veces de enriquecimiento	Benjamini	FDR
MF00107: Kinase	86	5.77956989	6.68968E-07	1.72558967	1.398E-4	8.4452E-4
MF00108: Protein kinase	68	4.56989247	9.29454E-06	1.73700140	9.7081E-4	0.01173303
MF00126: Dehydrogenase	32	2.15053763	2.8276E-4	2.00021197	0.01950907	0.35638051
MF00123: Oxidoreductase	71	4.77150537	5.9677E-4	1.49772870	0.02464379	0.75077381
MF00261: Actin binding cytoskeletal protein	40	2.68817204	2.80201E-3	1.62442364	0.07068307	3.48030055
MF00091: Cytoskeletal protein	73	4.90591397	7.63658E-3	1.34716657	0.10130483	9.22408705
MF00071: Translation factor	17	1.14247311	2.81380E-3	2.28303897	0.06333992	3.49470003
MF00166: Isomerase	21	1.41129032	3.76944E-3	2.00593441	0.07589561	4.65577076

Tabla 2. Análisis de la expresión génica implicada en la ruta del citoesqueleto de actina en células embrionarias de ratón GCS-2. Análisis bioinformático DAVID.

Unigene ID	Símbolo del gen	Nombre del gen	Veces de cambio (log2)
Mm.261329	Myl12a	Myosin	-7.7
Mm.2647	Pfn1	Profilin	-5.16
Mm.97858	Kif1B	Kinesin family member 1B	-4.04
Mm.142729	Tmsb4	Thymosin beta 4	-2.9
Mm.25321	Nudcd3	NudC domain containing 3	-1.92
Mm.21687	Limd2	Lim domain containing 2	-1.91
Mm.392504	Capza2	Capping protein muscle Z-line beta alpha 2	-1.78
Mm.253564	Actn1	Actinin, alpha 1	-1.63
Mm.441340	Kif6	Kinesin family member 6	-1.55
Mm.329322	Fhod3	Formin homolog 2 containing 3	-1.41
Mm.52297	Fnbp1	Formin binding protein 1	-1.41
Mm.428571	Septin 11	Septin II	-1.39
Mm.272460	Gabarap	Gamma.aminobutyric acid receptor associated protein	-1.28
Mm.143877	Mapre1	Microtubule associated protein RP/EB family 1	-1.25
Mm.157770	Cnn2	Calponin 2	1.01
Mm.28357	Map1lc3b	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta	1.2
Mm.99996	Kif1c	Kinesin Family member 1c	1.23
Mm.478285	Dcin5	Dynactin 5	1.26
Mm.278357	Klc1	Kinesin light chain 1	1.26
Mm.276826	Cfl2	Cofilin 2	1.27
Mm.295284	Stom	Stomatin	1.27
Mm.276504	Nudcd2	NudC domain containing 2	1.28
Mm.40068	Tubb3	Tubulin beta 3 Class III	1.3
Mm.7688	Kif3c	Kinesin Family member 3c	1.32
Mm.258986	Mark2	Microtubule affinity regulating kinase 2	1.34
Mm.299774	Jup	Junction plakoglobin	1.34
Mm.272368	Crip1	Cystein-Rich protein 1	1.38
Mm.249479	Dync1i2	Dynein cytoplasmic 1 intermediate chain2	1.38
Mm.5567	Palim1	PDZ and Lim domain 1 (elfin)	1.42
Mm.27063	Trip6	Thyroid hormone receptor interactor 6	1.44
Mm.205601	Ctnn	Cortactin	1.48
Mm.30010	Arpc1b	Actin related protein 2/3 complex subunit 1B	1.49
Mm.273538	Tubb5	Tubulin beta 5 class1	1.49
Mm.392113	Tuba1b	Tubulin alpha 1B	1.56
Mm.20829	Emp3	Epithelial membrane protein3	1.6
Mm.271967	Lasp1	Lim and SH3 protein 1	1.61

Mm.208601	Tln1	Talin 1	1.62
Mm.289306	Arpc4	Actin related protein 2/3 complex subunit 4	1.64
Mm.289106	Add1	Aduccin 1 (alpha)	1.64
Mm.6919	Dctn1	Dynactin 1	1.65
Mm.238285	Ketd10	Potassium channel tetramerisation	1.74
Mm.38450	Sept 9	Septin 9	1.88
Mm.21109	Gsn	Gelsolin	1.93
Mm.271711	Tagln2	Transgelin 2	2.11
Mm.329655	Cfl1	Cofilin 1	2.27
Mm.289707	Fscn	Fascin homolog1	2.44
Mm.288974	Arpc5	Actin related protein 2/3 complex subunit 5	2.91
Mm.1287	Mapt	Microtubule-associated protein TAU	3.08
Mm.275648	Pdlim7	PDZ and Lim domain 7	4.18
Mm.441431	Syn2	Synapsin II	4.64
Mm.371777	Pmp2	Peripheral myelin protein 2	5.34
Mm.218624	Sh3yl1	SH3 domain YSC-like 1	13.25

Depleción de los niveles intracelulares de GSH

Para lograr la máxima depleción de GSH en el menor tiempo posible, las células MSN se trataron a concentraciones de 25 y 50 mM de BSO durante 24 horas. En la Gráfico 1 se observa que hay una disminución significativa de la viabilidad celular junto con niveles de GSH indetectables en ambas concentraciones (Gráfico 1, Panel A y B). Debido a lo anteriormente encontrado, se evaluaron concentraciones más bajas de BSO, 5 y 12.5 mM con el fin de no afectar la viabilidad celular, pero que sean capaces de disminuir el contenido intracelular de GSH. Los tratamientos con 5 y 12.5 mM de BSO durante 24 horas demostraron ser efectivos al disminuir los niveles de GSH en aproximadamente un 70% en comparación con el control, por lo que estas concentraciones se usaron para ensayos posteriores. Una vez establecidas las concentraciones de BSO evaluamos la viabilidad celular y el nivel de GSH a las 48 horas. Los tratamientos de BSO no afectaron la viabilidad celular en las células MSN y se observó que a las 48 horas se redujo aproximadamente en un 80% los niveles de GSH en comparación con el control (Tabla 3).

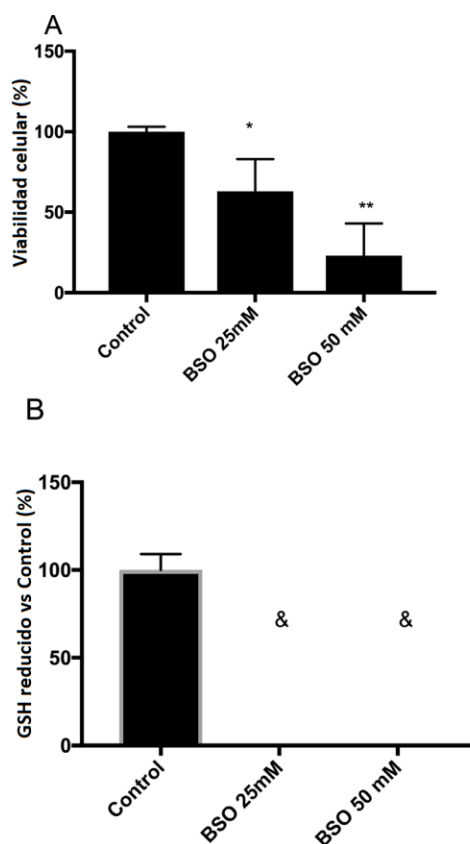


Gráfico 1. La disminución de los niveles de GSH intracelular disminuye la viabilidad celular. A) Viabilidad celular de células MSN tratadas con altas concentraciones de BSO (25 y 50 mM) durante 24 horas, evaluadas mediante tinción dual de fluorocromos. B) Niveles correspondientes de GSH intracelular de las células MSN tratadas con BSO (&: no detectado). Los niveles se determinaron fluorométricamente (el límite estimado de detección por el método fluorométrico fue de 0.31 nmol de GSH/mg de proteína). La significancia estadística se determinó mediante la prueba de t-Student. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los resultados mostrados son de tres experimentos independientes.

Tabla 3. Ausencia de estrés oxidativo bajo depleción de GSH.

Horas ^a	Tratamiento	Viabilidad celular ^{b,c}	GSH ^{b,d}	ERO ^{b,e}	LPx ^{b,f}
	Control	100.00 ± 4.82	100.00 ± 9.05	100 ± 6.95	100.00 ± 14.02
24	BSO 5 mM	105.40 ± 2.88	31.33 ± 6.03*	106.75 ± 10.03	82.21 ± 22.06
	BSO 12.5 mM	102.35 ± 0.36	23.21 ± 6.23*	100.91 ± 12.87	104.26 ± 19.08
	Control	100.00 ± 0.74	100.00 ± 6.05	100.00 ± 6.95	100.00 ± 14.02
48	BSO 5 mM	92.21 ± 5.07	15.45 ± 6.10*	109.50 ± 9.35	103.61 ± 19.59
	BSO 12.5 mM	89.14 ± 0.36	18.21 ± 5.09*	113.06 ± 13.96	128.81 ± 19.74

^a Duración del tratamiento en horas. ^b Los datos son expresados como porcentaje respecto a los controles ± error estándar. ^c Viabilidad celular determinada por FDA/EtBr después de los tratamientos con BSO. ^d Valores de GSH determinados por el método de orto-ftalaldehído (OPT) después de los tratamientos con BSO. ^eERO: especies reactivas de oxígeno, cuantificadas por la generación de rodamina 123 en células MSN después del tratamiento con BSO. Se uso CdCl₂ como control positivo en concentración de 50 µM por 2 horas: 138.29 ± 13.55. ^fLPx los niveles de lipoperoxidación se determinaron por el método TBARS usando una curva de MDA en células MSN después del tratamiento con BSO. Los experimentos se realizaron 3 a 7 veces. * Prueba t-Student; p<0.01 respecto al control.

Ausencia de estrés oxidante bajo depleción de GSH

La evaluación del estado redox de las células MSN después del tratamiento con BSO se determinó midiendo los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) y midiendo los productos finales de la lipoperoxidación (Lpx). Es importante enfatizar que el objetivo fue disminuir los niveles intracelulares de GSH sin promover un estado de estrés oxidante, con el fin de establecer el efecto de la depleción de GSH sobre la regulación del citoesqueleto de actina. La determinación de ERO se midió por la generación de rodamina 123 en células MSN tratadas con BSO a

concentraciones de 5 y 12.5 mM durante 24 y 48 horas. En la Tabla 3 se observa que no hubo cambios en los niveles de ERO en comparación con la condición control, lo que sugiere que la depleción intracelular de GSH no indujo la generación de ERO. Además, se midieron los productos finales de LPx y se observó que las células MSN tratadas con 5 y 12.5 mM de BSO durante 24 horas no generaron más productos finales de LPx que el tratamiento control, sin embargo, en el tratamiento con 12.5 mM de BSO por 48h se observó un ligero aumento en los productos de Lpx sin ser significativo. Para confirmar que la disminución de GSH intracelular no indujera estrés oxidante, se realizó un análisis multivariado de los marcadores de estrés oxidante (ERO y Lpx) contra la viabilidad celular en los tratamientos con BSO. En la Tabla 4 se muestra que ni ERO ni Lpx afectaron la viabilidad celular por lo que se puede inferir que no hubo generación de estrés oxidante.

Tabla 4. Análisis multivariado de marcadores de estrés oxidante con la viabilidad celular

Regresión lineal múltiple	Coefficiente	Error estándar	<i>p</i>	VIF
Constante	139.162	50.107	0.069	
ERO	-0.222	0.568	0.722	2.425
LPx	-0.153	0.118	0.284	2.425

El modelo de regresión lineal múltiple usa un conjunto de variables independientes (ERO y LPx) para explicar las influencias en la variable dependiente (viabilidad celular). En este caso, el análisis muestra que ninguna de las variables independientes parece necesaria para predecir la viabilidad celular, lo que significa que los niveles detectados de ERO y Lpx no afectan la viabilidad celular.

La depleción de GSH provoca cambios en la morfología celular

En la Figura 5 se muestran las imágenes de microscopía confocal, en donde se evidencian los cambios morfológicos en las células MSN, resultado de la depleción de GSH debido al tratamiento con BSO.

Tras el tratamiento por 24 horas, las imágenes de confocal correspondientes a la proteína actina muestran que las células control tienen una morfología característica además de que se encuentran polarizadas. En un extremo de las células se observaron estructuras tipo lamelipodia (flecha) con algunas proyecciones citoplásmicas o filopodios (punta de flecha), mientras que en el extremo contrario se observó una forma de cono (flecha vacía) con algunas proyecciones citoplásmicas y estructuras en forma punto (punta de flecha vacía) que aparentan ser adherencias focales. En las imágenes de confocal de las células control, se observan perfectamente los microtúbulos como fibras largas que se distribuyeron a lo largo del citoplasma, en la periferia de la célula y delimitando el espacio ocupado por el núcleo. Las imágenes de confocal de la proteína actina después del tratamiento con 5 mM de BSO mostraron pérdida de la morfología celular característica y cambios en la polaridad celular, incluyendo grandes proyecciones citoplásmicas a lo largo de la superficie celular, así como la presencia de estructuras tipo lamelipodia (flecha), filopodia (punta de flecha) y estructuras en forma de punto cerca de estas proyecciones (punta de flecha vacía). Por el contrario, los microtúbulos mostraron las mismas características y distribución que en el tratamiento control. Después del tratamiento con 12.5 mM de BSO, las imágenes de confocal de la proteína actina mostraron cambios drásticos en la polaridad celular con la presencia de estructuras tipo lamelipodia (flecha), gran número de filopodios (punta de flecha) y varias estructuras en forma de puntos (punta de flecha vacía). También observamos la presencia de un filopodio que se asemeja a una neurita en el extremo de la célula (flecha vacía). En el caso de los microtúbulos, permanecieron sin cambios en la estructura y organización. Los microtúbulos tanto en la condición control como en los tratamientos con BSO, mostraron cambios en su distribución que corresponden a los cambios en la forma de la célula debido al reordenamiento del citoesqueleto de actina (Figura 5, Panel A).

Después del tratamiento por 48 horas, los filamentos de actina y los microtúbulos en las células MSN control mostraron un patrón similar al descrito en el control de 24 horas. En las imágenes de confocal del tratamiento por 48 horas

con 5 mM de BSO, la pérdida de la morfología celular característica, presente en las células MSN control, fue evidente, con cambios drásticos en la polaridad y retracción del citoplasma, dando como resultado una forma redonda, con proyecciones citoplasmáticas o filopodios (punta de flecha) que se extiende más allá del borde de la membrana y una marcada presencia de estructuras en forma de punto (punta de flecha vacía). En cuanto a los microtúbulos no se observaron alteraciones. Después del tratamiento con 12.5 mM de BSO por 48 horas, las células MSN mostraron cambios similares a los observados después del tratamiento a 48 horas con 5 mM de BSO: el citoplasma se retractó, se redondeó, los filopodios estaban presentes a lo largo de la periferia de la célula (punta de flecha) y en algunas células fue muy evidente la presencia de estructuras tipo neuritas (flecha vacía), lo que les dio a las células una morfología tipo neurona. Sin embargo, no se evidenciaron cambios importantes en la estructura u organización de los microtúbulos, pero sí cambios en la distribución que corresponden a los reordenamientos del citoesqueleto de actina y en la forma de la célula (Figura 5, Panel B)

Comparación de las formas celulares

Para poder visualizar y comparar los cambios en la morfología celular, se utilizó el paquete Fiji de ImageJ para el procesamiento de imágenes, con el fin de aislar 25 imágenes de la morfología celular predominante, tanto en los controles como en los tratamientos con BSO, por lo cual se utilizaron las imágenes de microscopia confocal correspondientes a la tinción de actina. En la Figura 6 se muestra la morfología celular predominante en la condición control (24 y 48 horas, panel superior). En estas imágenes se observa que las células están polarizadas, en un extremo tienen una estructura tipo lamelipodio (flecha) con algunas proyecciones citoplásmicas o filopodios (punta de flecha) y en el otro extremo se observa la forma de cono (flecha vacía) con la presencia de algunos filopodios (punta de flecha). En contraste, los diferentes tratamientos con BSO (panel inferior) muestran pérdida de la morfología celular característica de la célula MSN

(aproximadamente un 70% de las células), cambios drásticos en la polaridad, y un mayor número de proyecciones citoplasmáticas de tipo lamelipodio y filopodio (flecha y punta de flecha respectivamente), y en algunos casos el tamaño del filopodio asemeja a un axón (flecha vacía) dándole a la célula una morfología de tipo neurona (Figura 6).

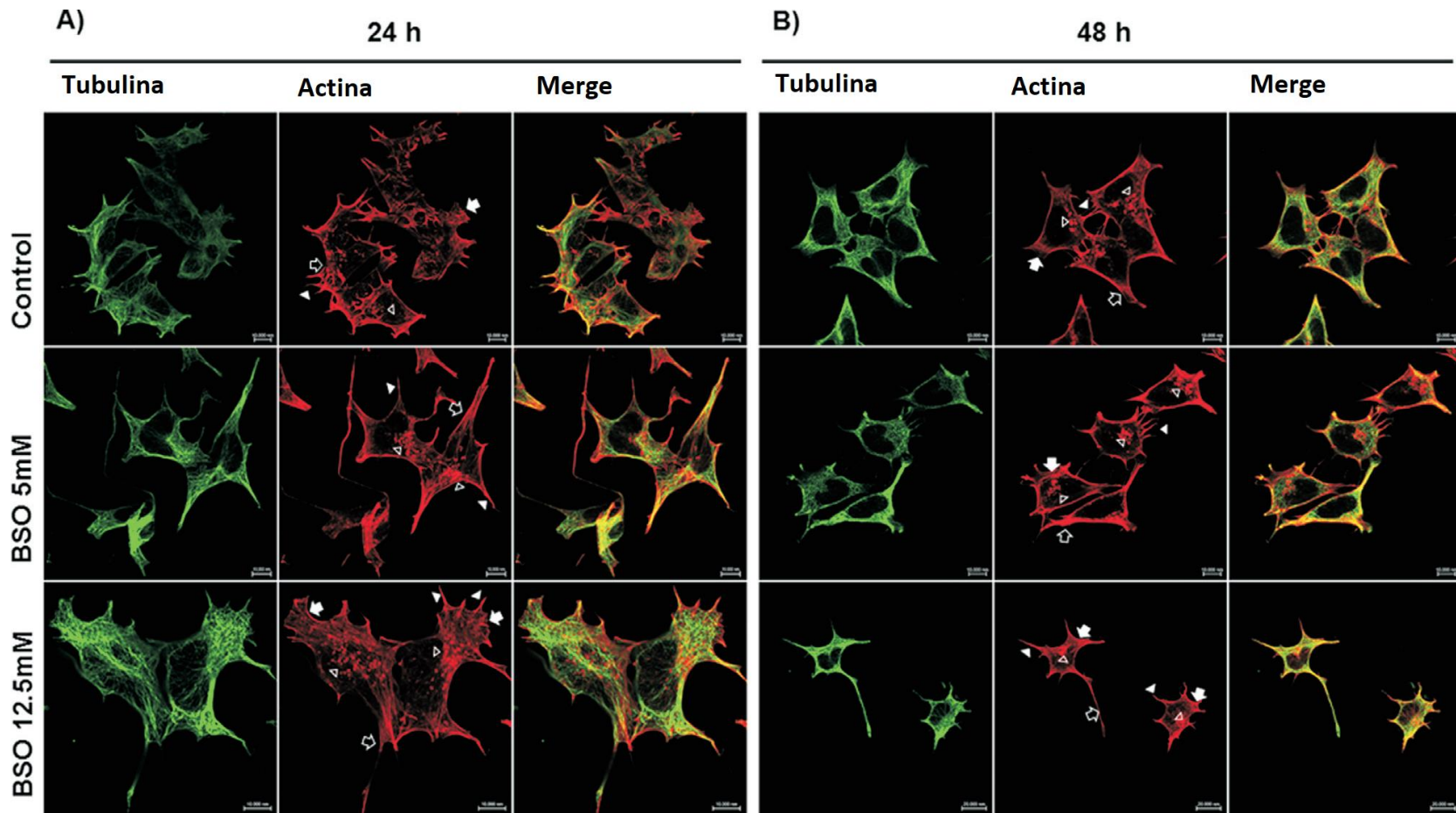


Figura 5. Comparativa de los cambios morfológicos inducidos por los tratamientos de BSO por 24 y 48 horas. Imágenes de microscopía confocal de células MSN, que muestran que los tratamientos con BSO por 48 horas causaron cambios morfológicos más drásticos en comparación a los tratamientos con BSO por 24 horas. El panel A corresponde a los tratamientos con BSO 5 y 12.5 mM por 24 horas. El panel B corresponde a los tratamientos con BSO 5 y 12.5 mM durante 48 horas. Los microtúbulos fueron teñidos con una inmunofluorescencia empleando anticuerpos contra β -tubulina y anticuerpo secundario marcado con FITC. Los filamentos de actina se visualizaron mediante la tinción con faloidina acoplada a Alexa Flour® 594. La barra representa 10 μ m a 40x. Flecha: lamelipodia; punta de flecha: filopodia; flecha vacía: forma de cono; punta de flecha vacía: proyecciones citoplásmicas y estructuras en forma de puntos.

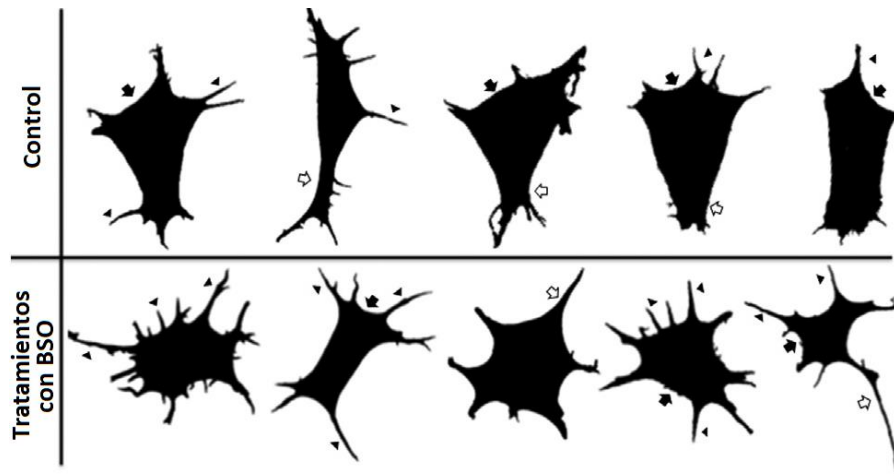


Figura 6. Cuadro comparativo de las formas predominantes en 25 células MSN control y tratadas con BSO. Utilizando el paquete Fiji de ImagenJ, para el procesamiento de imágenes, se obtuvieron imágenes de la morfología predominante en células control (panel superior) y células tratadas con BSO (panel inferior). Flecha: lamelipodia; punta de flecha: filopodia; flecha vacía: proyecciones citoplásmicas.

Niveles de expresión génica y abundancia de las proteínas de unión a actina en condiciones de depleción de GSH

Se determinaron los niveles de expresión génica y abundancia proteica de las proteínas de unión a actina: timosina $\beta 4$, gelsolina, profilina y actina después del tratamiento con 5 y 12.5 mM de BSO durante 24 y 48 horas. El tratamiento con BSO a ambas concentraciones por 24 horas indujo una disminución importante en la expresión de timosina $\beta 4$, gelsolina y profilina (gráfico 2, panel A). Sin embargo, en el tratamiento con BSO a ambas concentraciones, por 48 horas se observa que esta disminución se pierde, obteniéndose valores de expresión similares al control (gráfico 2, panel B). En el caso de la expresión génica de actina se mantiene sin cambios significativos en ambas concentraciones a 24 y 48 horas de tratamiento.

La expresión proteica se evaluó de igual manera que la expresión génica, después de los tratamientos con BSO 5 y 12.5 mM por 24 y 48 horas. En el tratamiento con BSO 5 mM por 24 horas, las proteínas gelsolina y timosina $\beta 4$ presentan una reducción de la expresión de aproximadamente 20%, sin embargo, en el tratamiento con 12.5 mM de BSO por 24 horas solo se observó una ligera

disminución en la expresión de la proteína profilina. En el tratamiento con BSO 5 mM por 48 horas se observó una ligera disminución en la expresión proteica de timosina β 4 y profilina (Gráfico 3).

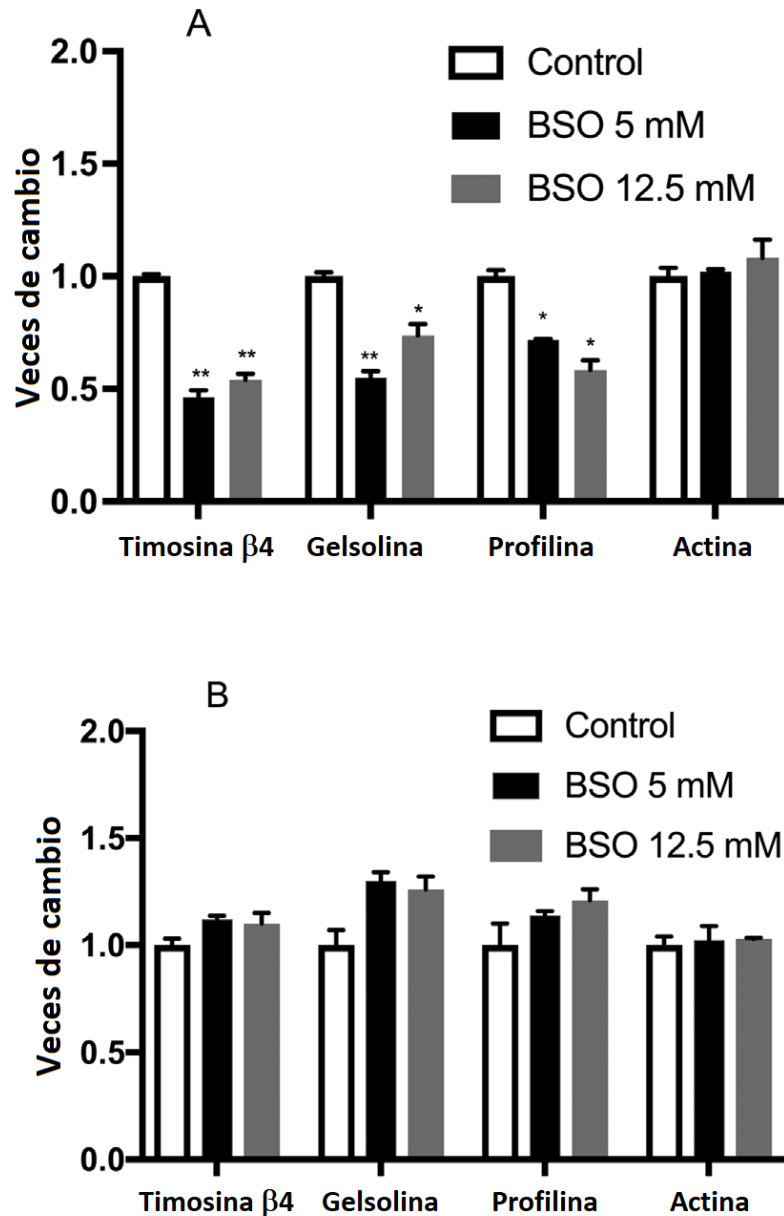


Gráfico 2. Efecto del tratamiento de BSO en la expresión génica en células MSN. A) Expresión génica en células MSN tratadas con BSO 5 y 12.5 mM por 24 horas. B) Expresión génica en células MSN tratadas BSO 5 y 12.5 mM por 48 horas. Las barras representan las veces de cambio respecto al control. Todos los datos se normalizaron previamente contra el gen de constitutivo RPL32. La diferencia estadísticamente significativa se determinó mediante t-Student * $p < 0.05$. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

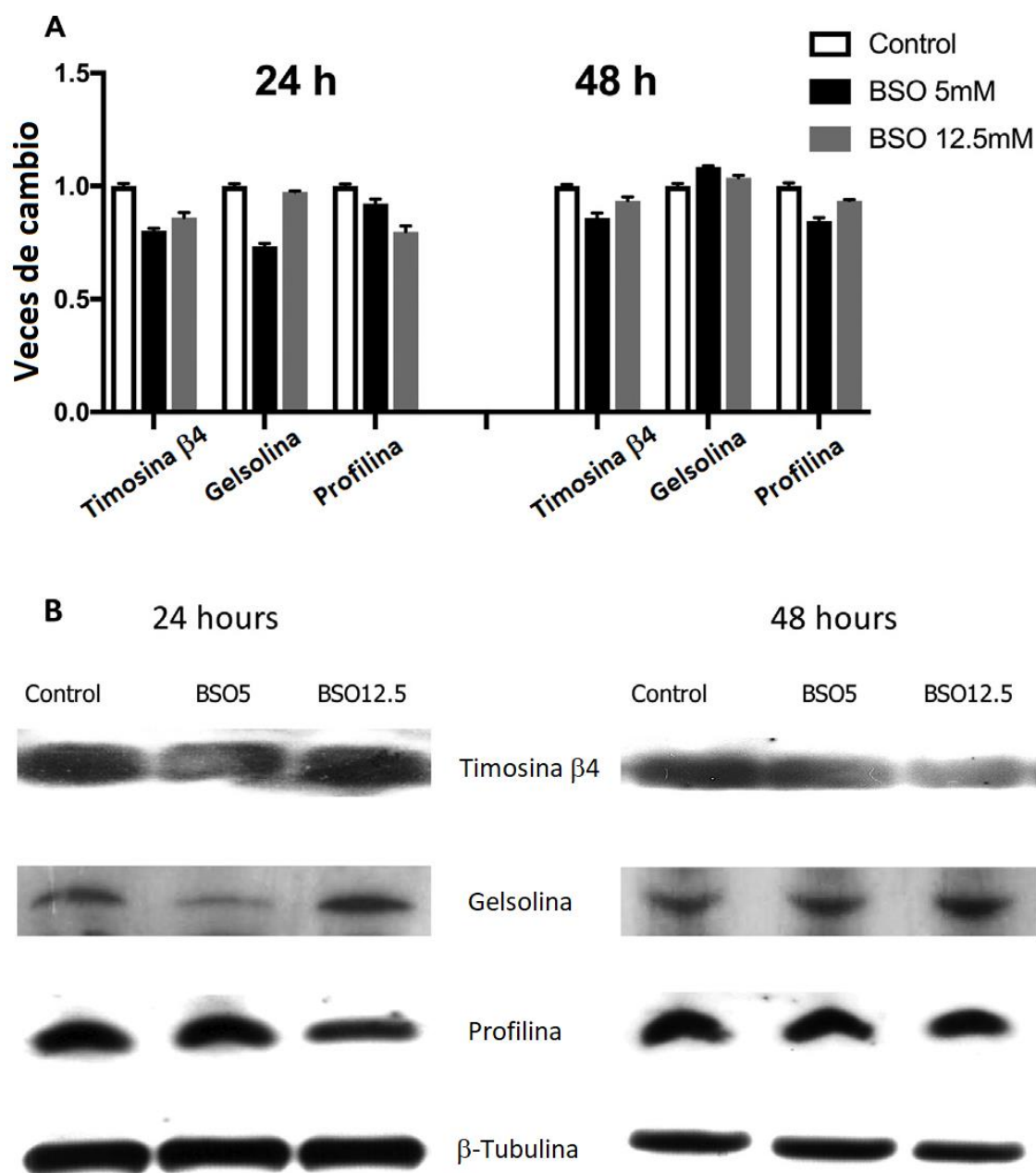


Gráfico 3. Efecto del tratamiento de BSO en la expresión proteica en células MSN. A) Expresión de las proteínas en células MSN tratadas con BSO 5 y 12.5 mM durante 24 y 48 horas. B) Imágenes de Western Blot representativas de las células MSN tratadas con BSO 5 y 12.5 mM durante 24 y 48 horas. Las barras representan las veces de cambio respecto al control. Todos los datos se normalizaron contra β -Tubulina. Los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

Localización celular de proteínas de unión a actina: Timosina β 4, Gelsolina y Profilina

Evaluamos la presencia de las proteínas timosina β 4, gelsolina y profilina mediante inmunofluorescencia para comparar su distribución contra la distribución de los filamentos de actina, estos resultados se muestran en la Figura 7. Se observó que en la condición control en el tratamiento por 24 horas, la proteína gelsolina se distribuyó tanto en el citoplasma como en las proyecciones citoplásmicas de las células (ya sea lamelipodios o filopodios). En el citoplasma observamos que la gelsolina se encuentra tanto libre (punta de flecha vacía) y colocalizada con los filamentos de actina (punta de flecha), sin embargo, se observa que también colocaliza con los filamentos de actina cuando está cerca de la membrana y en las proyecciones citoplásmicas (flecha). En los tratamientos con 5 y 12.5 mM de BSO por 24 horas, la gelsolina se encontró libre en el citoplasma (punta de flecha vacía) y colocalizada con los filamentos de actina (punta de flecha), siendo similar a lo observado en la condición control, sin embargo, cerca de la membrana celular y las proyecciones citoplásmicas, se observa que gelsolina está fuertemente colocalizada con los filamentos de actina. Esta colocalización fue más evidente en las proyecciones citoplásmicas (flecha). No obstante, en el tratamiento con 12.5 mM de BSO, gelsolina se encontró libre en los extremos distales de las proyecciones (flecha vacía). En el tratamiento por 48 horas, en la condición control, observamos que gelsolina se encontró distribuida en el citoplasma y en las proyecciones citoplásmicas: se encontró gelsolina libre en el citoplasma (punta de flecha vacía) y otra parte se encontró colocalizada con los filamentos de actina cerca de la membrana celular (punta de flecha) y en las proyecciones citoplasmáticas (flecha). En los tratamientos con 5 y 12.5 mM de BSO por 48 horas, gelsolina se distribuyó en el citoplasma (punta de flecha vacía), en las proximidades de la membrana celular (punta de flecha) y en las proyecciones citoplasmáticas (flecha). Su colocalización con los filamentos de actina fue más evidente en las proyecciones citoplásmicas, donde se encuentra fuertemente colocalizada (flecha). De forma similar al tratamiento de 24 horas, gelsolina se encontraba libre en el extremo distal de las proyecciones citoplásmicas o filopodios (flecha vacía).

En cuanto a la proteína profilina, en el tratamiento por 24 horas, se encontró una distribución similar tanto en las células control como en las células tratadas con 5 y 12.5 mM de BSO. Profilina fue confinada en el citoplasma localizado lejos de la membrana celular y no colocalizó con los filamentos de actina (punta de flecha vacía). Posteriormente, en el tratamiento por 48 horas, las células control exhibieron el mismo comportamiento, con profilina confinada en el citoplasma sin alcanzar la región de la membrana citoplasmática (punta de flecha vacía). Sin embargo, la distribución de la proteína se extendió más en las células tratadas con 5 y 12.5 mM de BSO por 48 horas (punta de flecha), llegando incluso a la membrana celular y colocalizándose con los filamentos de actina (flecha).

Respecto a timosina $\beta 4$, se observa que en las células control solo se encuentra en citoplasma y no se encontró localización simultánea con los filamentos de actina (punta de flecha vacía) en el tratamiento por 24 horas con 5 y 12.5 mM de BSO. En el tratamiento por 48 horas, se observa que timosina $\beta 4$ se distribuyó en el citoplasma (punta de flecha vacía) en las células control, sin embargo, después del tratamiento con 5 y 12.5 mM de BSO, la distribución de timosina $\beta 4$ alcanzó las proyecciones citoplásmicas y colocalizó con los filamentos de actina (flecha).

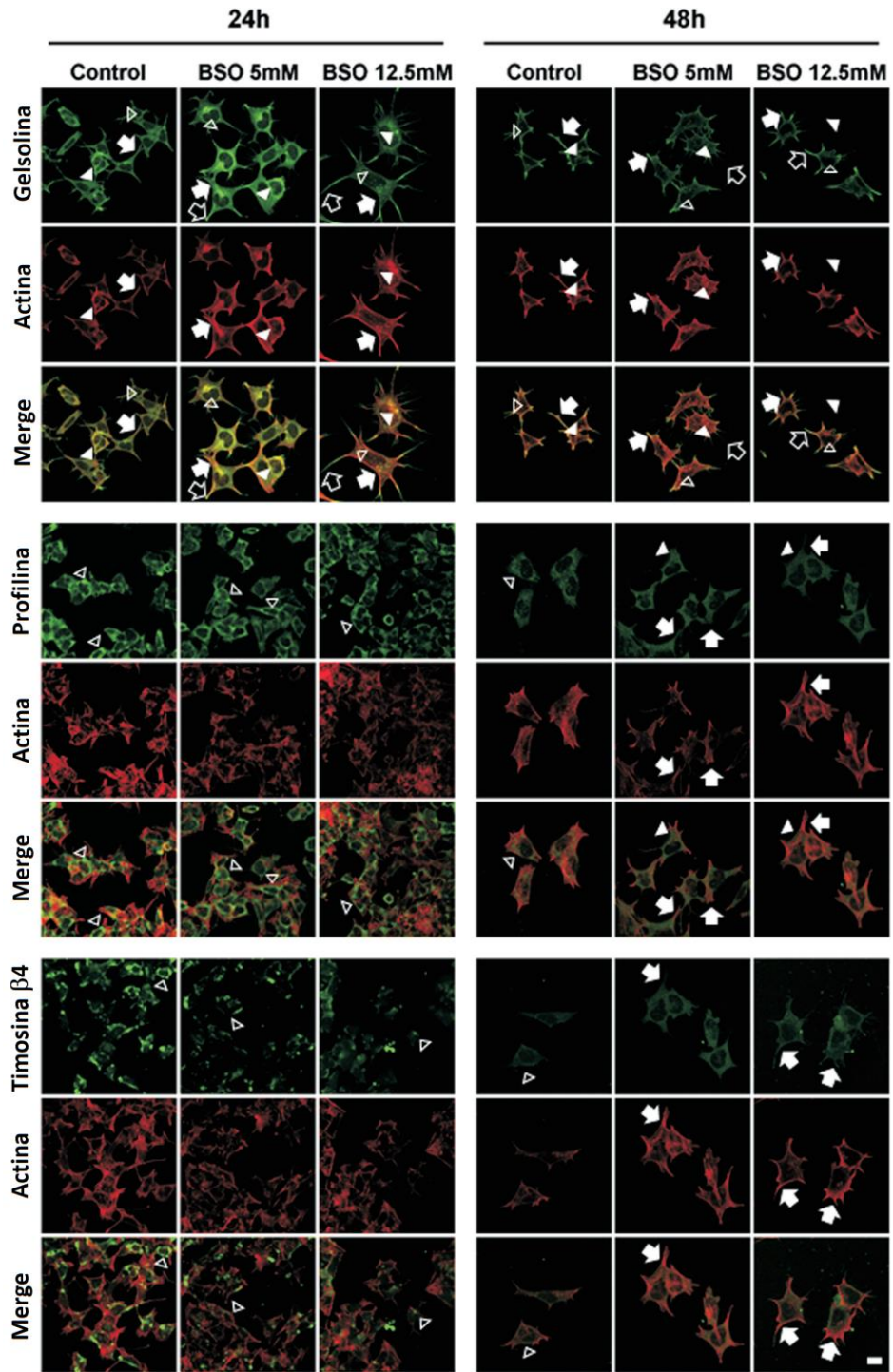


Figura 7. Distribución celular de las proteínas de unión a actina Gelsolina, Profilina y Timosina $\beta 4$. Para visualizar las proteínas Gelsolina, Profilina y Timosina $\beta 4$ se emplearon los anticuerpos primarios correspondientes y anticuerpos secundarios acoplados a FITC (verde), mientras que los filamentos de actina se tiñeron con Faloidina Alexa Fluor® 594. Se empleó objetivo 40x.

DISCUSION

Dado el papel esencial del GSH en las funciones fisiológicas de las células y las predicciones obtenidas del análisis genómico de las células GCS-2, incapaces de sintetizar GSH (Rojas et al., 2003; Valverde et al., 2006), se demostró que la remodelación del citoesqueleto de actina y las vías accesorias pueden estar reguladas por el GSH. Para comprobar esta hipótesis, evaluamos el papel del GSH en la regulación del citoesqueleto de actina en células de neuroblastoma MSN. Evaluamos las concentraciones 5 y 12.5 mM de BSO, con las cuales se logró disminuir el contenido intracelular de GSH en aproximadamente un 70% sin afectar la viabilidad celular ni generar ERO a 24 y 48 horas de tratamiento. Los resultados mostraron que las células MSN son más sensibles a la depleción de GSH que otros tejidos (tales como el riñón e hígado), concordando con las investigaciones previas, sin embargo, la depleción de GSH resultó compatible con la viabilidad de las células (Stabel-Burow et al., 1997).

El tratamiento con BSO disminuyó el contenido intracelular de GSH de manera parcial, lo que sugiere que hay dos fuentes de GSH en las células MSN: uno que se agota fácilmente por el tratamiento con BSO y otro que es más resistente al agotamiento (Chen et al., 2005). Este hallazgo apoya la existencia de dos fuentes de GSH.

Una vez demostrada la depleción de los niveles intracelulares de GSH, evaluamos el estado redox de las células MSN después del tratamiento con BSO, midiendo los niveles de ERO y los productos finales de la lipoperoxidación. Cabe destacar que nuestro objetivo fue disminuir los niveles intracelulares de GSH sin generar estrés oxidante para así poder determinar el papel de GSH en la regulación del citoesqueleto de actina, esto dado que ya se ha demostrado que el estrés oxidante altera al citoesqueleto de actina (Fiaschi et al., 2006; Johansson and Lumberg 2007; Pierozan et al., 2016). En los tratamientos con BSO no encontramos cambios en los niveles de ERO en comparación con la condición control, lo que

sugiere que la depleción intracelular de GSH no indujo la generación de ERO (tabla 3). Se midieron también los productos finales de la lipoperoxidación y se encontró que las células MSN tratadas con 5 y 12.5 mM de BSO por 24 horas no generaron lipoperoxidación; en contraste, se observó un ligero aumento después del tratamiento por 48 horas con 12.5 mM de BSO. Para garantizar que la depleción de GSH no indujera estrés oxidante, realizamos un análisis de regresión lineal múltiple para evaluar la influencia de ERO y la lipoperoxidación sobre la viabilidad celular, en los tratamientos con BSO. El análisis mostró que tanto ERO como la lipoperoxidación parecen no ser necesarios para predecir la viabilidad celular, dicho de otra manera, los niveles de ERO y lipoperoxidación no afectaron la viabilidad celular, infiriendo que no hay generación de estrés oxidante. Esto concuerda con lo observado por Franco y Cidioswki (2009), así como por Han et al. (2007), apoyando la noción de un papel directo del GSH, independiente del estrés oxidante. La sobreproducción de ROS puede ser un epifenómeno asociado con la depleción de GSH

Los datos del microarreglo de las células GCS-2 y los resultados de expresión de genes y proteínas de las células MSN confirman que la falta de GSH intracelular modula la expresión génica de timosina β 4, gelsolina y profilina, observando una disminución importante en la expresión de estos genes. Sin embargo, los datos de microarreglo indicaban solo la regulación negativa de timosina β 4 y profilina, mientras que gelsolina estaba regulada positivamente. Esta discrepancia podría deberse a los diferentes tipos de células utilizadas en cada estudio (blastocistos y neuroblastos) o debido a que las células GCS-2 son incapaces de sintetizar GSH, conteniendo aproximadamente el 2% de los niveles normales de GSH. Nuestros experimentos no obtuvieron los valores de inhibición de GSH obtenidos en investigaciones previas (Shi et al., 2000), sin embargo, observamos el mismo comportamiento en el nivel de proteína, donde obtuvimos una reducción discreta del 20% a las 24 horas de tratamiento, estando ausente a las 48 horas.

Las imágenes de microscopia confocal mostraron cambios morfológicos drásticos en las células MSN cuando se disminuyó el GSH por el tratamiento con

BSO. Teñimos los filamentos de actina y los microtúbulos (otro componente importante del citoesqueleto) para visualizar la distribución del citoesqueleto de actina, y, por lo tanto, la forma de la célula en comparación con la distribución de microtúbulos. Se observa que los filamentos de actina son abundantes debajo de la membrana citoplásmica, donde forman una red extendiéndose por todo el citoplasma. Las células control mostraron una forma característica celular y se polarizaron: un lamelipodio y algunos filopodios estaban presentes en un extremo, mientras que en el otro extremo tenían una forma de cono y había adherencias focales presentes. Los tratamientos con BSO dieron como resultado la pérdida de la forma celular característica y cambios en la polaridad celular. Se observaron grandes proyecciones citoplásmicas a lo largo de la superficie celular, tanto lamelipodios como filopodios y se detectaron adherencias focales con una relocalización de las proteínas timosina $\beta 4$, gelsolina y profilina. Además, las células formaron una estructura tipo neurita. En este caso, la estructura se parecía a un axón debido al origen neuronal de las células MSN. Estas observaciones concuerdan con nuestros resultados previamente obtenidos (Ramos-Espinosa et al., 2012) y con los obtenidos por Mollinari et al. (2009) que mostraron una mayor extensión de neuritas acompañada de un incremento en las adherencias focales, debido a la regulación negativa de timosina $\beta 4$.

Para visualizar los cambios descritos anteriormente, usamos el paquete procesador de imágenes Fiji para poder analizar 25 imágenes de formas celulares representativas en las células control y las tratadas con BSO. Las formas celulares predominantes en las condiciones control se polarizaron con un lamelipodio y con filopodios presentes en un extremo, mientras que el otro extremo tenía forma de cono. Sin embargo, los diferentes tratamientos con BSO dieron como resultado la pérdida constante y evidente de la forma característica de la célula, cambios dramáticos de polaridad, proyecciones citoplásmicas más evidentes, presencia de lamelipodios y filopodios y en algunos casos los filopodios asemejaban a un axón que daba a la célula una forma de neurona. Los cambios drásticos inducidos por los tratamientos con BSO fueron más allá de la ultraestructura del citoesqueleto de actina. Encontramos que la depleción de GSH podría alterar la regulación de la

dinámica de citoesqueleto de actina, causando la formación de neuritas en células MSN cultivadas. Sin embargo, estos cambios no ocurrieron en un cultivo celular indiferenciado, eliminando un posible efecto *per se* del BSO. El proceso de formación de neuritas está regulado de maneras complejas. Su crecimiento y orientación dependen de una dinámica citoesquelética bien coordinada y ocurre junto con los procesos de diferenciación y plasticidad celular (Wilson et al. 2016). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la depleción de los niveles intracelulares de GSH pueden afectar los procesos implicados en la vía de señalización que regulan el crecimiento de las neuritas (Bradke and Dotti 2000a, b; Luo 2002; Madduri et al., 2009; Wilson et al., 2016)

En conclusión, la depleción de GSH produjo una subexpresión de las proteínas de unión a actina, profilina, timosina $\beta 4$ y gelsolina a las 24 horas de tratamiento con BSO. Esta regulación negativa parece ser suficiente para desencadenar cambios importantes en su localización y forma celular de una manera no dependiente del estrés oxidante. Estos resultados son relevantes porque la exposición a xenobióticos podría disminuir los niveles de GSH y presentar un cofactor que desencadene cambios en el citoesqueleto para facilitar la adquisición de varias características distintivas de ciertas enfermedades, incluidas las relacionadas con el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas.

CONCLUSIONES

La dinámica del citoesqueleto de actina puede ser regulada por el contenido intracelular de GSH y por su efecto sobre las proteínas de unión a actina.

La depleción de aproximadamente un 70% de los niveles intracelulares de GSH no generó ERO, lipoperoxidación ni afectó la viabilidad celular.

Los tratamientos con BSO generaron cambios en la morfología celular característica de las células MSN, así como cambios en la polaridad celular.

La disminución de los niveles intracelulares de GSH en las células MSN generó proyecciones citoplasmáticas, adherencias focales y la adquisición de una morfología tipo neurona.

GSH regula la expresión de las proteínas de unión a actina, tales como profilina, timosina β 4 y gelsolina, desencadenando cambios en su localización y distribución en la célula, independiente de los niveles de ERO.

BIBLIOGRAFÍA

- Aoyama K, Watabe M and Nakaki T. Regulation of neuronal glutathione síntesis. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108: 227–238.
- Bains J and Shaw C. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev.* 1997; 25: 335-358.
- Becker A, Karam F and Soliman. The role of intracellular glutathione in inorganic mercury-induced toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochem Res.* 2009; 34: 1677-1684.
- Birbach A. Profilin, a multi-modal regulador of neuronal plasticity. *BioEssays.* 2008; 30: 994-1002.
- Bouaïcha N and Maatouk I. Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett.* 2004; 148: 53–63.
- Bradke F and Dotti CG. Changes in membrane trafficking and actin dynamics during axon formation in cultured hippocampal neurons. *Micros Res Tech.* 2000; 48: 3-11.
- Bradke F and Dotti CG. Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Curr Biol.* 2000a; 10: 1467-1470.
- Bradke F and Dotti CG. Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 2000b; 10: 574-581.
- Briden E, Murat U, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012; 5: 9-19.
- Browne R and Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in Molecular Biology Free Radical and Antioxidant Protocols.* 1998; 108: 347-352.
- Cairns N, Lee V and Trojanowski J. The cytoskeleton in neurodegenerative diseases. *J Pathol.* 2004; 204: 438–449.

- Chen J, Small-Howard A, Yin A and Berry M. The responses of Ht22 cells to oxidative stress induced by buthionine sulfoximine (BSO). *BMC Neuroscience*. 2005; 6:10.
- Cotgreave IA, Gerdes RG (1998). Recent trends in glutathione biochemistry-glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 242 (1): 1-9.
- Dedova IV, Nikolaeva OP, Safer D, De la Cruz EM and dos Remedios CG. Thymosin β 4 induces a conformational change in actin monomers. *Biophys J*. 2006; 90: 985-992.
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 2000; 62: 649-671.
- Dringen R, Gutterer J and Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain. Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem*. 2000; 267: 4912-4916.
- Dong J, Ying G, Liu X, Wang W, Wang Y, Ni Z and Zhou C. Lesion-Induced Gelsolin upregulation in the hippocampus following entorhinal deafferentation. *Hippocampus*. 2006; 16: 91–100.
- Dong J, Ying G and Zhou C. Entorhinal deafferentation induces the expression of Profilin mRNA in the reactive microglial cells in the hippocampus. *Glia*. 2004; 47: 102–108.
- Eskiocak S, Gozen AS, Yapar SB, Tavas F, Kilic AS and Eskiocak M (2005) Glutathione and free sulphhydryl content of seminal plasma in healthy medical students during and alter exam stress. *Human reproduction*. 20:9, 2595-2600.
- Fiaschi T, Cozzi G, Raugei G, Formigli L, Ramponi G and Chiarugi P. Redox regulation of β -actin during Integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem*. 2006; 281 (32): 22983–22991
- Franco R and Cidlowski JA. Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ*. 2009; 16: 1303-1314.
- Griffith O and Meister A. Differential inhibition of glutamine and γ -glutamylcysteine synthetases by α -alkyl analogs of methionine sulfoximine that induce convulsions. *J Biol Chem*. 1978; 253 (7): 2333-2338.

- Griffith O and Meister A. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-Butyl Homocysteine Sulfoximine). *J Biol Chem.* 1979; 254 (16): 7558-7560.
- Han YH, Kim SZ, Kim SH and Park WH. Apoptosis in pyrogallol-treatment Calu-6 cells is correlated with the changes of intracellular GSH levels rather than ROS levels. *Lung Cancer.* 2007; 59: 301-314.
- Hartmann A and Speit G. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SGE), *Mutat Res.* 1995; 346: 49-56.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009; 4(1):44-57.
- Järvinen K, Soini Y, Kaklos K and Kinnula V. Overexpression of γ -glutamylcysteine synthetase in human malignant mesothelioma. *Hum Pathol.* 2002; 33 (7): 748-755.
- Johansson M and Lundberg M. Glutathionylation of beta-actin via a cysteinyl sulfenic acid intermediary. *BMC Biochemistry.* 2007; 8:26.
- Keelan J, Allen N, Antcliffe D, Pal S and Duchon M. Quantitative imaging of glutathione in hippocampal neurons and glia in culture using monochlorobimane. *J Neurosci Res.* 2001; 66: 873–884.
- Kirkland RA, Saavedra GM and Franklin JL. Rapid activation of antioxidant defense by nerve growth factor suppresses reactive oxygen species during neuronal apoptosis: evidence for a role in cytochrome c redistribution. *The Journal of Neuroscience.* 2007; 27 (42): 11315-11326.
- Lee V, Quinn P and Jennings S. NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblast used as models. *Hipertensión.* 2003; 41 (4): 925-931.
- Levasseur R, Barrios R, Eleftheriou F, Glass DA, Lieberman MW and Karsenty G. Reversible skeletal abnormalities in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Endocrinology.* 2003; 144 (7): 2761-2764.

- Lewis-Wambi J, Kim H, Wambi C, Patel R, Pyle J, Klein-Szanto A and Jordan C. Buthionine sulfoximine sensitizes antihormone-resistant human breast cancer cells to estrogen-induced apoptosis. *Breast Cancer Res.* 2008; 10:6.
- Lieberman MW, Wiseman AL, Shi ZZ, Carter BZ, Barrios R, Ou CN, Chévez-Barrios P, Wang Y, Habib GM, Goodman JC, Huang SL, Lebovitz RM and Matzuk MM. Growth retardation and cysteine deficiency in γ -glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1996; 93: 7923-7926.
- Lodish, H., et al., 2008, *Molecular cell biology*, 6^a ed., E.U.A.
- Luo L. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002; 18: 601-635.
- Madduri S, Papaloïzos M and Gander B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation *in vitro*. *Neurosci Res.* 2009; 65: 88-97.
- Meister A and Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem.* 1983; 52: 711-760.
- Mollinari C, Ricci-Vitiani L, Pieri M, Lucantoni C, Rinaldi AM, Racaniello M, De Maria R, Zona C, Pallini R, Merlo D and Garaci E. Downregulation of thymosin β 4 in neural progenitor grafts promotes spinal cord regeneration. *J Cell Sci.* 2009; 122: 4195-4207.
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95: 351-358.
- Pierozan P, Biasibetti H, Schmitz F, Avila H, Fernandes CG, Pesooa-Pureur R and Wyse AT. Neurotoxicity of methylmercury in isolated astrocytes and neurons: the cytoskeleton as a main target. *Mol Neurobiol.* 2016; 54: 5752-5767.
- Popoli, P., Pepponi, R., Martire, A., Armida, M., Pèzzola, A., Galluzo, M., Domeneci, M., Potenza, R., Tebano, M., Mollinari, C., Merlo, D. y Garaci, E. Neuroprotective effects of thymosin β 4 in experimental models of excitotoxicity. *Ann NY. Acad Sci.* 2007; 1112: 219–224.
- Qiao, H., Koya, R., Nakagawa, K., Tanaka, H., Fujita, H., Takimoto, M. and Kuzumaki, N. Inhibition of Alzheimer's amyloid- β peptide-induced reduction

of mitochondrial membrane potential and neurotoxicity by gelsolin. *Neurobiol Aging*. 2005; 26: 849–855.

- Quiroz-Baez R, Rojas E and Arias C. Oxidative stress promotes JNK-dependent amyloidogenic processing of normally expressed human APP by differential modification of α -, β - and γ -secretase expression. *Neurochem*. 2009; 55: 662-670.
- Ramaekers F and Bosman F. The cytoskeleton and disease. *J Pathol*. 2004; 204: 351–354.
- Ramos-Espinosa P, Rojas E and Valverde M. Differential DNA damage response to UV and hydrogen peroxide depending of differentiation stage in a neuroblastoma model. *Neurotoxicology*. 2012; 33: 1086-1095.
- Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, Reynolds DA, Ross RA, Frenkel EP and Smith RG. Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *JNCI*. 1986; 76 (3): 375-378.
- Rojas E, Shi ZZ, Valverde M, Paules RS, Habib GM and Lieberman MW. Survival and changes in gene expression in cells unable to synthesize glutathione. *BioFactors*. 2003; 17: 13-19.
- Sandhu J, Gardaneh M, Iwasio R, Lanthier P, Gangaraju S, Ribocco-Lutkiewicz M, Tremblay R, Kiuchi K and Sikorska M. Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2009; 33: 405–414.
- Shi Z-Z, Osei-Frimpong J, Kala G, Kala S, Barrios R, Habib G, Lukin D, Danney C, Matzuk M and Lieberman M. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *PNAS*. 2000; 97: 5101–5106.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27: 916-921.
- Stabel-Burow J, Kleu A, Schuchmann S and Heinemann U. Glutathione levels and never cell loss in hippocampal cultures from trisomy 16 mouse- a model of Down syndrome. *Brain Res*. 1997; 765: 313-318.

- Strauss GH. Non Random Cell killing in cryopreservation, implications for performance of battery of leucocyte test (BLT)1, Toxic and immunotoxic effect. *Mutat Res.* 1991; 252: 1-15.
- Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M and Yin H. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *The Journal of Biological Chemistry.* 1999; 274 (47): 33179-33182.
- Valverde M, Rojas E, Kala S, Kala G and Lieberman MW. Survival and cell death in cells constitutively unable to synthesize glutathione. *Mutat Res.* 2006; 594: 172–180.
- Volodymyr I. Lushchak. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *Journal of Amino Acids*, vol. 2012, Article ID 736837, 26 pages, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/736837>.
- Wang, G., Zhang, Y., Chen, B. and Cheng, J. Preliminary studies on Alzheimer's disease using cDNA microarrays. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124: 115-124.
- Wickstead B, Gull K. The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2011; 194: 513-525.
- Wilson C, Terman JR, Gonzalez-Billault C and Ahmed G. Actin filaments-a target for redox regulation. *Cytoskeleton.* 2016; 73: 577-595.
- Witke W, Sutherland JD, Sharpe A, Arai M and Kwiatkowski DJ. Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *PNAS.* 2001; 98 (7): 3832-3836.
- Ying G, Liu X, Wang W, Wang Y, Dong J, Jin H, Huang C and Zhou C. Regulated transcripts in the hippocampus following transections of the entorhinal afferents. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322: 210-216.
- Zheng-Zheng S, Osei-Frimpong J, Kala G, Kala S, Barrios R, Habib M, Lukin D, Danney C, Matzuk M and Lieberman M. Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *PNAS.* 2000; 97(10): 5101-5106.

***ANEXO. ARTÍCULO: GLUTATHIONE DEPLETION TRIGGERS ACTIN
CYTOSKELETON CHANGES VIA ACTIN-BINDING PROTEINS***



Glutathione depletion triggers actin cytoskeleton changes via actin-binding proteins

Nahum Zepeta-Flores¹, Mahara Valverde¹, Alejandro Lopez-Saavedra² and Emilio Rojas¹

¹*Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico.*

²*Unidad Biomédica de Investigación en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Cancerología, México. D.F., Mexico.*

Abstract

The importance of glutathione (GSH) in alternative cellular roles to the canonically proposed, were analyzed in a model unable to synthesize GSH. Gene expression analysis shows that the regulation of the actin cytoskeleton pathway is strongly impacted by the absence of GSH. To test this hypothesis, we evaluate the effect of GSH depletion via buthionine sulfoximine (5 and 12.5 mM) in human neuroblastoma MSN cells. In the present study, 70% of GSH reduction did not induce reactive oxygen species, lipoperoxidation, or cytotoxicity, which enabled us to evaluate the effect of glutathione in the absence of oxidative stress. The cells with decreasing GSH levels acquired morphology changes that depended on the actin cytoskeleton and not on tubulin. We evaluated the expression of three actin-binding proteins: thymosin β 4, profilin and gelsolin, showing a reduced expression, both at gene and protein levels at 24 hours of treatment; however, this suppression disappears after 48 hours of treatment. These changes were sufficient to trigger the co-localization of the three proteins towards cytoplasmic projections. Our data confirm that a decrease in GSH in the absence of oxidative stress can transiently inhibit the actin binding proteins and that this stimulus is sufficient to induce changes in cellular morphology via the actin cytoskeleton.

Keywords: Glutathione, BSO, thymosin β 4, gelsolin, profiling.

Received: June 01, 2017; Accepted: November 18, 2017.

Introduction

Glutathione (GSH) is a tripeptide synthesized in two adenosine triphosphate-dependent steps: the glutamate cysteine ligase (GCL; rate-limiting enzyme in GSH synthesis) forms the dipeptide γ -L-glutamyl-L-cysteine, and then the glutathione synthetase binds a glycine to form GSH or γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine (Bains and Shaw, 1997; Dringen, 2000). GSH acts as a redox buffer due to its cysteine sulfhydryl group (-SH); GSH can therefore react directly with radicals through non-enzymatic reactions and constitutes the main barrier against oxidative damage caused by reactive oxygen species (ROS). GSH can also form xenobiotic conjugates through its enzymatic glutathione S-transferase activity and acts as an electron donor in the peroxide reduction catalyzed by the glutathione peroxidase enzyme (GPx) (Camera and Picardo, 2002).

Additionally, GSH and GSH metabolism have been implicated in cancer prevention, progression and treatment response. As a scavenger molecule, GSH can inhibit the ac-

tion of different molecules through their interaction, including harmful molecules and anticancer drugs (Siddik, 2003; Wang and Lippard, 2005; Franco and Cidlowski, 2009; Chen and Tien Kuo, 2010). Also, GSH levels appear to be reduced after exposure to some xenobiotics (Becker and Soliman, 2009; Pierozan *et al.*, 2016). In the nervous system, GSH is needed for defense against oxidative stress, and alterations in GSH metabolism have been reported in different pathologies including Parkinson's disease and Alzheimer's disease (Bains and Shaw, 1997; Ramaekers and Bosman, 2004). Thus, a reduced level of GSH appears to represent an important step in cell destabilization.

In addition to its several functions, data generated in our workgroup on a GCS-2 cell line (a GCL knockout cell line that is unable to synthesize GSH (Shi *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2006) suggested that the reduced level of intracellular GSH (2% of the wild type value of GSH) could generate changes in the expression of several genes. In addition, these cells can survive in the complete absence of GSH if N-acetyl cysteine is provided in the medium; thus, the reducing equivalents provided by GSH, and not GSH itself, protect cells from apoptosis. This means that GCS-2 cells with a severe reduction in GSH produce a metastable state compatible with survival. The

Send correspondence to Emilio Rojas. Depto. Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510. México, Mexico. E-mail: emilior@biomedicas.unam.mx.

results provided by this particular cell model could indicate that cell survival is compatible with low GSH intracellular levels without alterations of redox. In the present study, from the analysis of global expression of the GSC-2 model identifies the role of the absence of GSH in the pathways involved in the remodeling of the actin cytoskeleton and explores the hypothesis in a neuroblastoma model, under intracellular GSH modulation.

This study used MSN neuroblastoma cells to represent an early stage in neuronal development in which cells are pluripotent and retain the capability of expressing multiple neural crest-derived phenotypes (Abemayor and Sidellet, 1989). These cells also appear to be very sensitive to thiols depletion and have been used previously to observe changes in the cytoskeleton (Arias *et al.*, 1993; Ko *et al.*, 1997; Stabel-Burow *et al.*, 1997).

The cytoskeleton is a dynamic system that consists of several filamentous networks that extend from the plasma membrane to the nuclear envelope and interconnect the cell nucleus to the extracellular matrix. Actin polymerizes to form filaments and participates in the generation and maintenance of cell morphology, polarity, endocytosis, intracellular trafficking, contractility, motility and cell division (Ramaekers and Bosman, 2004; Fu *et al.*, 2015). However, actin filaments by themselves are not able to perform the processes involved. Instead, these processes require many proteins, including actin-binding proteins. Actin-binding proteins are responsible for orchestrating rounds of polymerization-depolymerization of the actin filaments. Our work focuses on three of the relevant functions of the actin binding proteins in disease development: thymosin β 4, gelsolin and profilin (Winder and Ayscough, 2005; Lee *et al.*, 2013; Cui *et al.*, 2016).

Thymosin β 4 is a monomer-sequestering protein that maintains a large pool of actin that allows rapid filament growth, clamps ATP-actin, and prevents its incorporation into filaments (Dedova *et al.*, 2006). Gelsolin is a capping and severing protein that controls filament length by capping the barbed end, blocking the addition of new monomers and severing actin filaments to increase actin dynamics (Sun *et al.*, 1999). Finally, profilin is also a monomer-sequestering protein but is involved in binding to ADP-actin to promote the nucleotide exchange (ADP for ATP) and facilitate new rounds of polymerization (Hertzog *et al.*, 2004; Birbach, 2008).

Abnormalities in these essential cell components often result in disease (Ramaekers and Bosman, 2004). Studies have shown that the actin cytoskeleton and the actin-binding proteins participate in many processes related to carcinogenesis, such as invasion, metastasis and the epithelial-mesenchymal transition (Kedrin *et al.*, 2007; Lorente *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2016). Moreover, alterations in cytoskeletal components have been implicated in the progression of some neurodegenerative disorders (McMurray, 2000; Ying *et al.*, 2004).

Given the essential roles of the actin cytoskeleton and GSH in physiological and pathological processes, the aim

of the present study was to confirm the hypothesis generated by the model GCS-2 in a scenario of GSH depletion in the regulation and remodeling of the actin cytoskeleton in human MSN neuroblastoma cells.

Materials and Methods

GCS-2 cell model

Cell culture

All studies used M15 complete medium, “knockout” DMEM supplemented with 15% embryonic stem cell-qualified FBS, 2 mM glutamine, 0.1 mM β -mercaptoethanol (BME), 100 units/mL of penicillin, and 100 μ g/mL of streptomycin (all from GIBCO/BRL, Carlsbad, CA, USA, except BME, from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Mouse blastocyst cells derived from GCS^{-/-} and the ^{+/+}BDC1 mice were obtained. γ GCS-deficient cells (GCS-2) were maintained in the above medium with 2.5 mM GSH (Sigma-Aldrich) and changed with fresh GSH containing medium daily. In the experiments involving GSH withdrawal, cells were washed twice with 1X PBS (GIBCO/BRL) and replaced with complete medium without supplemental GSH. Cultures were maintained at 37 °C in humidified incubators containing 5% CO₂. Intracellular GSH levels in γ GCS-deficient cells grown in the presence or absence of GSH were determined using HPLC/EC detection as described by Kleinman and Riche Jr (1995). Viability and cell number were determined using trypan blue exclusion staining (Sigma-Aldrich). Briefly, aliquots of 2.5 x 10⁵ cells/mL were mixed with the trypan blue, and cells were examined by light microscopy. The results represent the average of three independent experiments with duplicate determinations.

cRNA preparation

We isolated total RNA using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and purified the RNeasy Total RNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The SuperScript Choice system (Invitrogen) was used to synthesize double-stranded cDNA. Phase Lock Gels-phenol and chloroform extractions (Eppendorf, Hamburg, Germany) were used to clean up the cDNA template. We then generated biotin-labeled cRNA from this template using a BIOARRAY HIGHYIELD RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA). *In vitro* transcription products were purified using RNeasy spin columns (Qiagen) and were quantified by spectrophotometric analysis. After the purification, the cRNA was fragmented using the standard procedure by Affymetrix to obtain a distribution of RNA fragments sized from approximately 35 to 200 bases. Fragmented RNA was checked with agarose gel electrophoresis.

Microarray analysis

A hybridization cocktail was prepared as recommended by Affymetrix, containing 0.05 μ g/ μ L fragmented cR-

NA, 50 pM control oligonucleotide B2, 1.5, 5, 25 and 100 pM eukaryotic hybridization controls with *bioB*, *bioC*, *bioD* and *cre* genes, respectively, 0.1 mg/mL herring sperm DNA, 0.5 mg/ml acetylated BSA and 1X hybridization buffer. This hybridization cocktail was heated to 99 °C for 5 min and then used to fill the probe array cartridge. Hybridization was performed for 16 h with a rotation of 60 rpm in a rotisserie oven at 45 °C.

After 16 h of hybridization, the hybridization cocktail was removed from the probe array, and the array was filled with non-stringent wash buffer. The GeneChip® Fluidics Station 400 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA) operated using Microarray Suite was used to wash and stain the probe arrays. We followed the manufacturer's single stain protocol for eukaryotic targets. Arrays were washed twice and stained with a 10 µg/L streptavidin phycoerythrin solution. After staining, a final wash with non-stringent buffer was performed, and the arrays were scanned.

Data analysis

Image quantification, background subtraction and scaling were carried out with dChip software (Harvard, Boston, MA, USA) with 100% recall between control and lower GSH level chips and $p < 0.05$ for the statistical algorithm (Li and Wong, 2001). DAVID Bioinformatics resources 6.8 was used to analyze the impacted pathways (Huang *et al.*, 2009).

MSN cell model

Adherent human neuroblastoma MSN cells were grown in monolayers (Reynolds *et al.*, 1986; Ramos-Espinosa *et al.*, 2012). The cells were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY, USA), 1% antibiotic-antimycotic (penicillin-streptomycin-amphotericin) (Gibco), 1% MEM non-essential amino acids (Gibco) and 1% QSN (glutamine-serine-asparagine) in tissue culture dishes in a humidified incubator under 95% air and a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Cells were subcultured at a density of 1×10^6 cells per dish and harvested by gently pipetting.

GSH depletion (BSO treatments)

A total of 1×10^6 MSN cells were seeded into a 100 mm tissue culture dish with 7 mL of supplemented RPMI 1640 medium. After 72 h, the culture was gently washed with PBS buffer, and 10 mL of supplemented RPMI 1640 medium was added. Buthionine sulfoximine (BSO, L-Buthionine-sulfoximine Sigma-Aldrich) treatments were administered at final concentrations of 0, 5, 12.5, 25 and 50 mM.

Cell viability

Cell viability was measured using the dual stain fluorescein diacetate (FDA)/ethidium bromide (BrEt) method as previously described (Hartmann and Speit, 1997). Briefly, the cells were mixed with a fluorochrome solution con-

taining 0.02 µg/mL Et-Br and 0.015 µg/mL FDA (Sigma-Aldrich). The cells were then analyzed under an Olympus BX-60 fluorescence microscope with a UM61002 filter (Olympus, Tokyo, Japan). One hundred randomly chosen cells were evaluated per condition.

Reduced glutathione quantification

We used o-phthalaldehyde (OPT) (Sigma-Aldrich) as the fluorescent reagent to quantify the level of reduced glutathione due its specificity for GSH. A total of 100 µL of cells in PBS supplemented with protease inhibitors and 100 µL of meta-phosphoric acid (Sigma-Aldrich) precipitating reagent (1.67 g meta-phosphoric acid, 0.2 g EDTA (AMRESCO, Solon, OH, USA) and 30 g NaCl in 100 mL of distilled water) were added to a 0.6 mL Eppendorf tube, vortexed and centrifuged. The supernatant was decanted and frozen at -70 °C prior to further quantification. A total of 50 µL of the supernatant was added to a 1.5 mL Eppendorf tube with 1 mL of GSH buffer (0.1 M NaH₂PO₄ and 0.005 M EDTA, pH 8.0). Then, 50 µL of OPT (1mg/mL in methanol) was added to obtain a GSH-fluorescent conjugate. Next, 200 µL of the mixture from each Eppendorf tube was plated in an opaque 96-well plate and incubated for 15 min in the dark. The fluorescence was read in a BioTek FLx800 Fluorescence Microplate Reader (Winooski, VT, USA) with the emission set at 420 nm and the excitation set at 350 nm (Browne and Armstrong, 1998).

Reactive Oxygen Species (ROS)

ROS were determined with a modified fluorometric assay (Lee *et al.*, 2003), which employs dihydrorhodamine 123 (DHR; Calbiochem-EMD Chemicals Inc. San Diego, CA, USA) as the probe. When DHR is oxidized by H₂O₂ in the presence of peroxidases, it produces the fluorescent compound rhodamine 123. Briefly, 100 µL of cells in PBS supplemented with protease inhibitors were centrifuged at 1,200 rpm for 5 min. Then, the supernatant was discarded, and 180 µL of buffer A (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄·7H₂O, 1.8 mM CaCl₂, 5 mM glucose and 15 mM HEPES, Sigma-Aldrich) and 20 µL of DHR (1 µM) were added and incubated at 37 °C for 2 min. The fluorescent product rhodamine 123 was measured using a spectrophotometer at 505 nm and interpolated in a curve of rhodamine 123.

Lipid Peroxidation (Lpx)

The thiobarbituric acid method was used to measure the concentration of malondialdehyde (MDA) (Bouaïcha and Maatouk, 2004). Briefly, 100 µL of cells in PBS supplemented with protease inhibitors and 100 µL of trichloroacetic acid (10% w/v) (Avantor Performance Materials Inc. Center Valley, PA, USA) were added to 1.5 mL Eppendorf tubes and centrifuged at 3,000 x g for 10 min. The supernatant was added to 1 mL of the thiobarbituric acid reagent (0.375%) (ICN Biomedicals Inc. Aurora, OH, USA), and the mixture was heated at 92 °C for 45 min. The

absorbance of the thiobarbituric acid-MDA complex was measured at 532 nm using an ELISA spectrophotometer (Model 550 microplate reader, Bio-Rad, Hercules, California, USA). The data were interpolated onto a concentration curve of MDA (1,1,3,3-tetraethoxypropane) ranging from 0 to 10 nM.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Total RNA was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. The RNA quantity and purity were determined spectrophotometrically. The reverse transcriptase-polymerase chain reactions (RT-PCR) were performed using the Access RT-PCR System (Promega, MADISON, WI, USA) according to the manufacturer's recommendations. The RT-PCR products were loaded onto a 3% agarose gel, and the mRNA levels were analyzed using the Kodak 1D v3.5.3 software. The following primers were used:

Actin (forward: catcatgaagtgtgacgtgg; reverse: ata-cctcctgttctgatcc),

Thymosin β 4 (forward: tgaacaggagaagcaagcag; reverse: tagacagatgggaaagcag),

Gelsolin (forward: acggctgaaggacaagaaga; reverse: ttccaaccagacaagacc),

Profilin (forward: ggaggcggattgaataagaag; reverse: c-catcacctgcattgctaa) and

Ribosomal Protein L32 (forward: aagaagttcatcggcaccag; reverse: gcgatctcggcacagtaagat).

Western blot analysis

MSN cells were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate and 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) with a protease inhibitor mixture and then centrifuged. Total proteins were quantified using a bicinchoninic acid kit (Thermo-Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). Equal amounts of protein were loaded onto a polyacrylamide gel and then transferred to a nitrocellulose or polyvinylidene fluoride membrane as required (Schägger, 2006). The membrane was blocked with 5% nonfat milk and 1% albumin in TBS and then sequentially incubated with a primary antibody and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The primary antibodies employed were goat polyclonal anti-Thymosin β 4 (1:2000), mouse monoclonal anti-Gelsolin (1:2000), rabbit polyclonal anti-Profilin 1/2 (1:2000), and mouse monoclonal anti- β Tubulin (1:2000) (all Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); the antibodies were dissolved in blocking solution and incubated at 37 °C for 1 h. Then, the membranes were washed with TBS-0.1% Tween-20 and incubated with the secondary antibody. The secondary antibodies employed were HRP-conjugated goat anti-rabbit, HRP-conjugated rabbit anti-goat and HRP-conjugated goat anti-mouse, all supplied by Zymed (San Francisco, CA, USA). The antibodies were dissolved in blocking solution and incubated at 37 °C for 1 h. The bands were visualized using the Amersham

ECL Western blotting detection reagents according to the manufacturer's guidelines (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

Immunofluorescence

A total of 10^5 MSN cells were seeded onto coverslips coated with 0.1% gelatin in a 12-well plate and incubated for 72 h or until sub-confluent. Then, the culture was gently washed with PBS buffer, the medium was renewed and the 5 and 12.5 mM BSO treatments were added. After 24 or 48 h of BSO treatment, the media was removed and the MSN cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS-0.2% Triton X-100. Prior to antibody incubation, the samples were blocked with 1% albumin and 5% fetal bovine serum in PBS. The primary antibodies employed were mouse anti- β -Tubulin (1:50; Invitrogen), goat polyclonal anti-Thymosin β 4 (1:50, Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-Gelsolin (1:50, Santa Cruz Biotechnology) and rabbit polyclonal anti-Profilin 1/2 (1:50, Santa Cruz Biotechnology). The antibodies were dissolved in blocking solution and incubated at 37 °C for 1 h. Then, the coverslips were washed three times with PBS-0.2% Triton X-100 for 5 min. The secondary antibodies employed were FITC-goat anti-mouse (1:100, Invitrogen), FITC-goat anti-rabbit (1:100, Invitrogen) and FITC-bovine anti-goat (1:100, Santa Cruz Biotechnology). Alexa Fluor® 594 Phalloidin (1:50, Invitrogen) was also employed to stain the actin filament, and 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich) was used to counterstain the cell nuclei. All of the secondary antibodies were dissolved in blocking solution. The cells were incubated with the secondary antibodies and Alexa Fluor® 594 Phalloidin at 37 °C for 1 h; DAPI was added during the last 5 min of the secondary antibody incubation. Finally, the coverslips were washed three times with PBS-0.2% Triton X-100 for 5 min, embedded in Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA) and mounted onto slides. The slides were examined using an Axio Observer inverted microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to a confocal laser scanning LSM 710 DUO from Carl Zeiss (Plan APOchromat 40X/1.3 oil objective). Images were acquired using the ZEN 2008 software (Carl Zeiss) and analyzed using the Fiji image processing package, which is distributed by ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012).

Statistical analysis

The results are expressed as the percentage \pm standard error (SE). Statistical significance was analyzed using one-way ANOVA and Student's *t*-test, and *p*-values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using the statistical software SigmaStat (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA), and histograms were generated using the SigmaPlot software. We also performed a multiple linear regression using the SigmaStat soft-

ware to determine whether the BSO treatments were related to the changes in cell viability, ROS and lipid peroxidation.

Results

Expression of actin cytoskeleton genes in cells unable to synthesize GSH-GCS-2

Global analysis of molecular functions in cells unable to synthesize GSH, obtained by the gene expression patterns and the number of genes involved with their respective *p*-value is presented in Table 1.

Expression analysis showed that the actin cytoskeleton pathway is largely impacted by GSH absence and that actin binding proteins, such as cofilin 1 and 2, fascin homolog and gelsolin, were overexpressed. In contrast, the thymosin B4, profilin and capping protein muscle z-line beta alpha-2 were underexpressed (Table 2).

Depletion of intracellular GSH levels

To achieve the maximum GSH depletion in the shortest amount of time, MSN cells were treated with 25 and 50 mM BSO for 24 h. We found significantly decreased cell viability and GSH levels at both concentrations (Figure 1A and 1B, respectively). Therefore, we tested lower BSO concentrations (5 and 12.5 mM) without a cell viability effect (Table 3). The 5 and 12.5 mM BSO treatments for 24 h could decrease the GSH level to approximately 70% compared with the control (Table 3). Therefore, we used these conditions for the assays. After we set up the working BSO concentrations, we evaluated the cell viability and GSH level following treatment for 48 h. The BSO treatments did not affect the cell viability of the MSN cells (Table 3), and the intracellular GSH level was decreased to approximately 80% compared with the control (Table 3).

Absence of oxidative stress under GSH depletion

The redox state evaluation of MSN cells after BSO treatment was determined by measuring ROS levels and the end products of Lpx. It is important to emphasize that our

aim was to decrease intracellular GSH levels without initiating an oxidative stress state to establish the effect trigger by GSH depletion on the regulation of the actin cytoskeleton. ROS were measured by the generation of rhodamine 123 in MSN cells treated with 5 and 12.5 mM BSO for 24 and 48 h. No changes in the ROS level were found compared to the control condition, suggesting that the depletion of the intracellular GSH level did not induce ROS generation (Table 3). Additionally, we measured Lpx end products and found that MSN cells treated with 5 and 12.5 mM BSO for 24 h were unable to generate Lpx end products; in contrast, a slight increase was observed after the 48 h treatment with 12.5 mM BSO. To ensure that the loss of GSH did not induce oxidative stress, we conducted a multiple linear regression analysis to evaluate the influence of ROS and Lpx due to GSH depletion by BSO treatment for cell viability (Table 4). Neither ROS nor lipid peroxidation appeared to be necessary to predict cell viability. Thus, the detected ROS and Lpx levels did not affect cell viability, and non-oxidative stress generation could be inferred.

Glutathione depletion triggers changes in the cell shape

Confocal microscopy images showed drastic morphological changes in the MSN cells when GSH was depleted by the BSO treatments (Figure 2). After 24 h of GSH depletion, the actin confocal images showed that the control cells displayed the characteristic cell shape and were polarized. Lamellipodia (arrow) with some cytoplasmic projections or filopodia (arrowhead) were observed at one end, whereas a cone shape (empty arrow) with a few cytoplasmic projections and dot-shaped structures (empty arrowhead) that appeared to be focal adhesions was observed at the other end. In the confocal images of control cells the microtubules were clearly resolved as long fibers that were distributed throughout the cytoplasm to the cell periphery and delimited the space occupied by the nucleus. Actin confocal images following the 5 mM BSO treatment showed the loss of the characteristic cell shape and changes in cell

Table 1 - Analysis of molecular functions impacted by the lack of GSH in mouse embryonic cells GCS-2 by DAVID Bioinformatics Resources 6.8.

Term	Count	%	<i>p</i> value	Fold Enrichment	Benjamini	FDR
MF00107: Kinase	86	5.77956989	6.68968E-07	1.72558967	0.00013980	0.00084452
MF00108: Protein kinase	68	4.56989247	9.29454E-06	1.73700140	0.00097081	0.01173303
MF00126: Dehydrogenase	32	2.15053763	0.00028276	2.00021197	0.01950907	0.35638051
MF00123: Oxidoreductase	71	4.77150537	0.00059677	1.49772870	0.02464379	0.75077381
MF00261: Actin binding cytoskeletal protein	40	2.68817204	0.00280201	1.62442364	0.07068307	3.48030055
MF00091: Cytoskeletal protein	73	4.90591397	0.00763658	1.34716657	0.10130483	9.22408705
MF00071: Translation factor	17	1.14247311	0.00281380	2.28303897	0.06333992	3.49470003
MF00166: Isomerase	21	1.41129032	0.00376944	2.00593441	0.07589561	4.65577076

DAVID Bioinformatics Resources 6.8; Term: Enrichment terms associated with the gene list; Count: Gene involved in the term; % : involved genes / total genes; *p*-value: modified Fisher exact *p*-value; Fold Enrichment: To globally correct enrichment *p*-values of individual term members.; Benjamini and FDR: To globally correct enrichment *p*-values to control family-wide false discovery rate under certain rate.

Table 2 - Analysis of gene expression involved in actin cytoskeleton pathway in mouse embryonic cells GCS-2 by DAVID Bioinformatics Resources 6.8.

Unigene ID	Gene Symbol	Name of the gene	Fold Change (log2)
Mm.261329	Myl12a	Myosin	-7.7
Mm.2647	Pfn1	Profilin	-5.16
Mm.97858	Kif1B	Kinesin family member 1B	-4.04
Mm.142729	Tmsb4	Thymosin beta 4	-2.9
Mm.25321	Nudcd3	NudC domain containing 3	-1.92
Mm.21687	Limd2	Lim domain containing 2	-1.91
Mm.392504	Capza2	Capping protein muscle Z-line beta alpha 2	-1.78
Mm.253564	Actn1	Actinin, alpha 1	-1.63
Mm.441340	Kif6	Kinesin family member 6	-1.55
Mm.329322	Fhod3	Formin homolog 2 containing 3	-1.41
Mm.52297	Fnbp1	Formin binding protein 1	-1.41
Mm.428571	Septin 11	Septin II	-1.39
Mm.272460	Gabarap	Gamma.aminobutyric acid receptor associated protein	-1.28
Mm.143877	Mapre1	Microtubule associated protein RP/EB family 1	-1.25
Mm.157770	Cnn2	Calponin 2	1.01
Mm.28357	Map1lc3b	Microtubule associated protein 1 light chain 3 beta	1.2
Mm.99996	Kif1c	Kinesin Family member 1c	1.23
Mm.478285	Dcin5	Dynactin 5	1.26
Mm.278357	Klc1	Kinesin light chain 1	1.26
Mm.276826	Cfl2	Cofilin 2	1.27
Mm.295284	Stom	Stomatin	1.27
Mm.276504	Nudcd2	NudC domain containing 2	1.28
Mm.40068	Tubb3	Tubulin beta 3 Class III	1.3
Mm.7688	Kif3c	Kinesin Family member 3c	1.32
Mm.258986	Mark2	Microtubule affinity regulating kinase 2	1.34
Mm.299774	Jup	Junction plakoglobin	1.34
Mm.272368	Crip1	Cystein-Rich protein 1	1.38
Mm.249479	Dync1i2	Dynein cytoplasmic 1 intermediate chain2	1.38
Mm.5567	Palim1	PDZ and Lim domain 1 (elfin)	1.42
Mm.27063	Trip6	Thyroid hormone receptor interactor 6	1.44
Mm.205601	Ctn	Cortactin	1.48
Mm.30010	Arpc1b	Actin related protein 2/3 complex subunit 1B	1.49
Mm.273538	Tubb5	Tubulin beta 5 class1	1.49
Mm.392113	Tuba1b	Tubulin alpha 1B	1.56
Mm.20829	Emp3	Epithelial membrane protein3	1.6
Mm.271967	Lasp1	Lim and SH3 protein 1	1.61
Mm.208601	Tln1	Talin 1	1.62
Mm.289306	Arpc4	Actin related protein 2/3 complex subunit 4	1.64
Mm.289106	Add1	Aduccin 1 (alpha)	1.64
Mm.6919	Dctn1	Dynactin 1	1.65
Mm.238285	Ketd10	Potassium channel tetramerisation	1.74
Mm.38450	Sept 9	Septin 9	1.88
Mm.21109	Gsn	Gelsolin	1.93
Mm.271711	Tagln2	Transgelin 2	2.11
Mm.329655	Cfl1	Cofilin 1	2.27
Mm.289707	Fscn	Fascin homolog1	2.44
Mm.288974	Arpc5	Actin related protein 2/3 complex subunit 5	2.91
Mm.1287	Mapt	Microtubule-associated protein TAU	3.08
Mm.275648	Pdlim7	PDZ and Lim domain 7	4.18
Mm.441431	Syn2	Synapsin II	4.64
Mm.371777	Pmp2	Peripheral myelin protein 2	5.34
Mm.218624	Sh3yl1	SH3 domain YSC-like 1	13.25

Table 3 - Absence of oxidative stress under GSH depletion.

Hours ^a	Treatment	Cell viability ^{b, c}	GSH ^{b, d}	ROS ^{b, e}	LPx ^{b, f}
24	Control	100.00 ± 4.82	100.00 ± 9.05	100.00 ± 6.95	100.00 ± 14.02
	BSO 5 mM	105.40 ± 2.88	31.33 ± 6.03*	106.75 ± 10.03	82.21 ± 22.06
	BSO 12.5 mM	102.35 ± 0.36	23.21 ± 6.23*	100.91 ± 12.87	104.26 ± 19.08
48	Control	100.00 ± 0.74	100.00 ± 6.05	100.00 ± 6.95	100.00 ± 14.02
	BSO 5 mM	92.21 ± 5.07	15.45 ± 6.10*	109.50 ± 9.35	103.61 ± 19.59
	BSO 12.5 mM	89.14 ± 0.36	18.21 ± 5.09*	113.06 ± 13.96	128.81 ± 19.74

^aLength of treatment in hours. ^bData are expressed as the percentage with respect to controls ± standard error. ^cCell viability after BSO treatments assessed by FDA/EtBr dual fluorochrome stain. ^dGSH values determined by o-phthalaldehyde (OPT) method after BSO treatment. ^eROS: reactive oxygen species; ROS were measured by the generation of rhodamine 123 in MSN cells after BSO treatment. ROS positive control (Cadmium chloride 50 µM, 2 h): 138.29 ± 13.55. ^fLPx: Lipid peroxidation; LPx level assessed with the TBARS method using a MDA curve in MSN cells after treatment with BSO. Experiments were performed three to seven times. * Student's *t*-test; *p*<0.01 versus control.

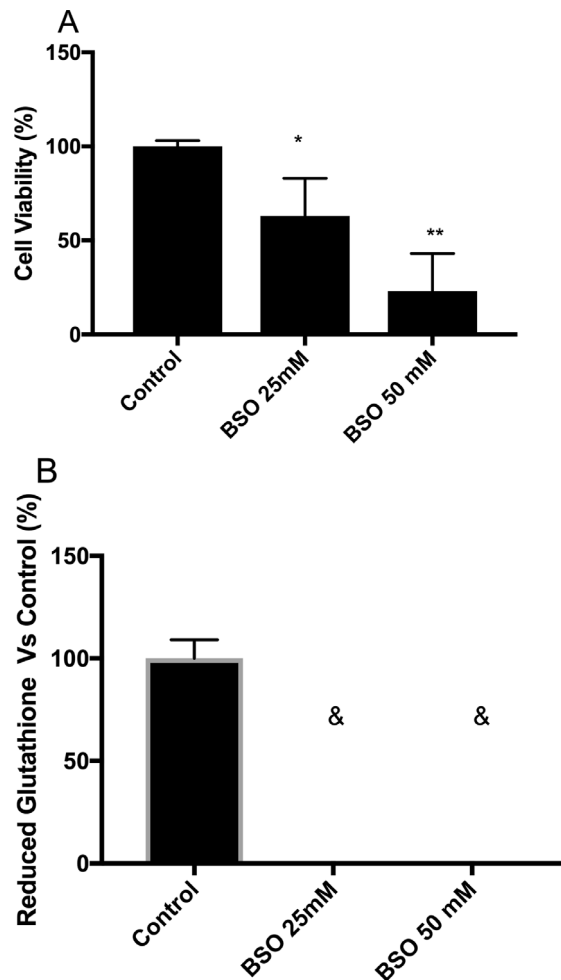


Figure 1 - Maximum depletion of intracellular GSH levels generate effects on survival. (A) Cell viability of MSN cells treated with high concentrations of buthionine sulfoximine, BSO, (25 and 50 mM) for 24 h assessed by fluorescein diacetate/ethidium bromide (FDA/EtBr) dual fluorochrome staining. (B) Corresponding intracellular GSH levels of MSN cells treated with BSO (&: not detected) determined fluorometrically (estimated limit of detection for the fluorometric method was 0.31 nmol of GSH/mg of protein). Statistical significance was determined by Student's *t*-test. **p*<0.05, ***p*<0.01. Experiments were performed three times.

polarity, including large cytoplasmic projections along the cell surface, the presence of both lamellipodia (arrow) and filopodia (arrowhead) and dot-shaped structures (empty arrowhead) near the projections. In contrast, the microtubules showed the same characteristics and distribution as the control treatment. Following the 12.5 mM BSO treatment, the actin confocal images showed drastic changes in cell polarity, with the presence of lamellipodia (arrow), many filopodia (arrowhead) and several dot-shaped structures (empty arrowhead). A large filopodium that resembled a neurite (in this case an axon) was observed at one end of the cell. Conversely, the microtubules remained unchanged in structure and organization. The microtubules in both the control and GSH-depleted conditions showed changes in distribution that corresponded to the changes in cell shape due to the actin cytoskeletal rearrangements (Figure 2A).

After the 48 h treatments, the actin filaments and microtubules in the MSN control cells showed a similar pattern to that described following the 24 h control treatment. In the confocal images of the 48 h 5 mM BSO treatment, the loss of the characteristic cell shape present in the MSN control cells was evident, with dramatic polarity changes, retraction of the cytoplasm resulting in a round shape, cytoplasmic projections (filopodia, arrowhead) that extended beyond the leading edge of the membrane and the marked presence of dot-shaped structures (empty arrow-

Table 4 - Multivariate analysis of oxidative stress markers with cell viability.

Multiple linear regression	Coefficient	Standard Error	<i>p</i>	VIF ^a
Constant	139.162	50.107	0.069	
ROS ^b	-0.222	0.568	0.722	2.425
LPx ^c	-0.153	0.118	0.284	2.425

^aVIF: variance inflation factor; ^bROS: reactive oxygen species; ^cLPx: lipid peroxidation. Multiple linear regression model uses a set of independent variables (ROS and LPx) to explain influences on the dependent variable (cell viability). In this case, the analysis shows that none of the independent variables appear necessary to predict cell viability, which means that the detected ROS and Lpx levels do not affect cell viability.

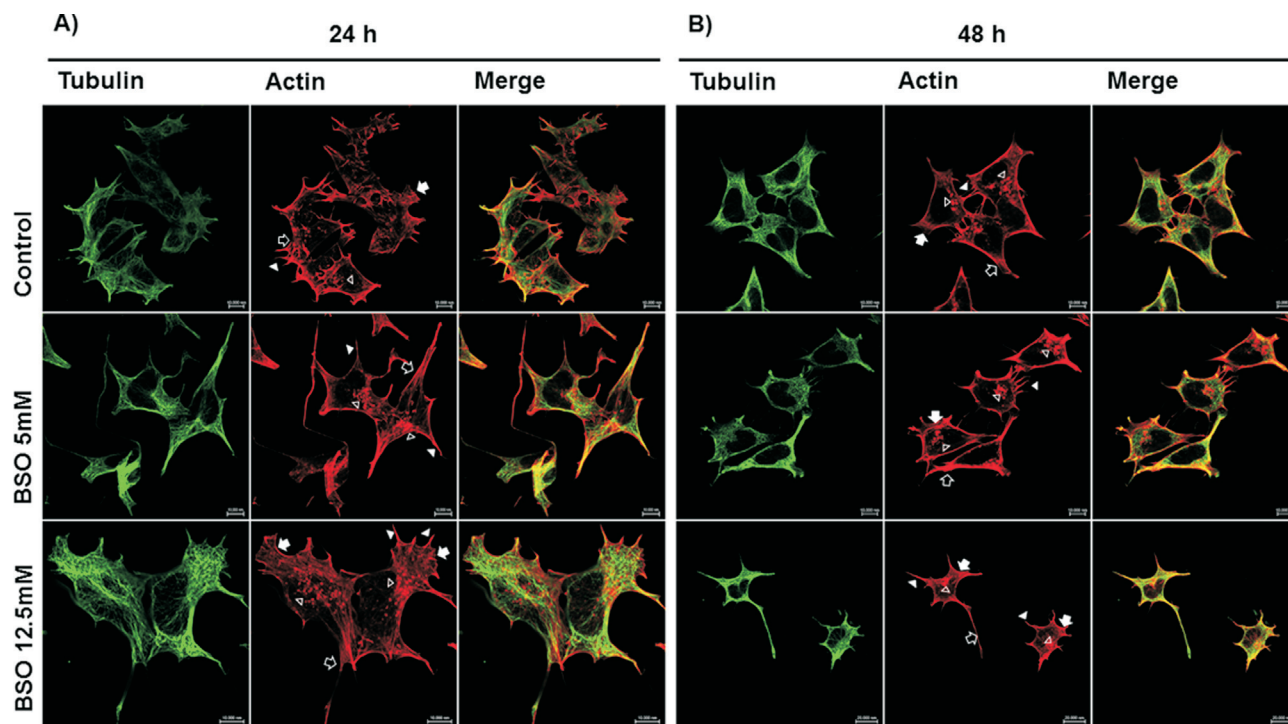


Figure 2 - Comparative morphological changes induced by 24 and 48 h BSO treatments. Confocal microscopy images of MSN cells showing that the 48 h BSO treatments caused more drastic morphological changes compared to the 24 h BSO treatments. Panel A corresponds to Control, BSO 5 mM and BSO 12.5 mM 24 h treatments; Panel B corresponds to Control, BSO 5 mM and BSO 12.5 mM 48 h treatments. Microtubules were visualized by staining with FITC-labeled β -Tubulin (mouse anti- β -tubulin/FITC-goat anti-mouse), and actin filaments were visualized by staining with Alexa Fluor® 594 Phalloidin-labeled F-actin. The bar represents 10 μ m 40X. Arrow: lamellipodia; arrowhead: filopodia; empty arrow: cone shape; empty arrowhead: cytoplasmic projections and dot-shaped structures.

head). No changes were observed in the microtubules. After the 48 h 12.5 mM BSO treatment, the MSN cells showed changes similar to those observed after the 48 h 5 mM BSO treatment: the cytoplasm retracted and became rounded, filopodia (arrowhead) were present along the cell periphery and in some cells a neurite axon-like structure was very evident and gave the cells a neuron-like shape (empty arrow). No important changes were evident in the structure or the organization of the microtubules, however they exhibited changes in distribution corresponding to the actin cytoskeletal rearrangements and the changes in cell shape (Figure 2B).

Comparison of cell shapes

To visualize the changes in cell shape in the confocal images we used the image processing package Fiji (distributed by ImageJ) to isolate 25 images of the predominant cell shapes in the control and BSO treatments. For this, we used the actin confocal images. Figure 3 shows the predominant cell shapes in the control conditions (24 and 48 h, upper panel). In these images, the cells are polarized, one end has a lamellipodium (arrow) with some cytoplasmic projections or filopodia (arrowhead), and the far end has a cone shape (empty arrow) with a few filopodia (arrowhead). In contrast, the different BSO treatments (lower panel) resulted in the constant (approximately 70% of the cells) and very evident loss of the characteristic cell shape, dramatic changes in polarity, more evident cytoplasmic projections,

either lamellipodia (arrow) or filopodia (arrowhead) and in some cases the filopodia resembles an axon (empty arrow) and gives the cell a neuron-like cell shape (lower panel).

Gene expression levels of actin-binding proteins under GSH depletion

Gene expression of the actin-binding proteins thymosin β 4, gelsolin, profilin and actin was evaluated after treatment with 5 and 12.5 mM BSO for 24 and 48 h. The GSH depletion for 24 h induced an important decrease in the expression of thymosin β 4, gelsolin and profilin

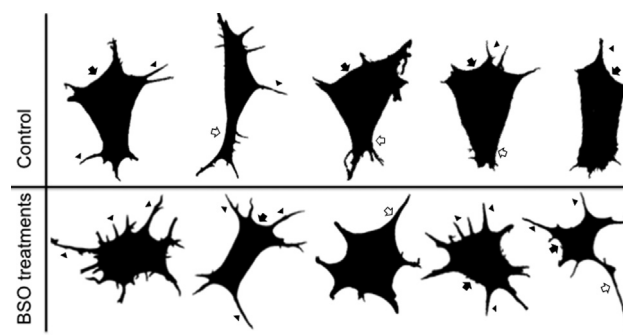


Figure 3 - Comparative chart of the predominant cell shapes in 25 cells in the control vs. BSO treatments. Using the image processing package Fiji (distributed by ImageJ), we obtained representative images of the predominant cell shapes in the control conditions (upper panel) and BSO treatments (lower panel). Arrow: lamellipodia; arrowhead: filopodia; empty arrowhead: cytoplasmic projections and dot-shaped structures.

(Figure 4A). However, 48 h of GSH depletion show that this sub-expression is lost (Figure 4B).

Protein expression levels of actin-binding proteins under GSH depletion

The protein expression of thymosin β 4, gelsolin, profilin and actin were evaluated after treatment with 5 and 12.5 mM BSO for 24 and 48 h. Analysis showed that gelsolin and thymosin β 4 had a 20% reduction in their expression at 24 h after 5 mM treatment. For the treatment with 12.5 mM, however, we only observed an effect on the profilin protein. For 48 h of treatment with 5 mM, we observed only a slight decrease for thymosin β 4 and profilin (Figure 5A,B).

Cell localization of actin-binding proteins: thymosin β 4, gelsolin and profilin

We performed an immunofluorescence analysis of thymosin β 4, gelsolin and profilin for a comparison with

the actin filament distributions (Figure 6). After 24 h treatment, gelsolin was widely distributed in both the cytoplasm and cytoplasmic projections of the control cells (either lamellipodia or filopodia). In the cytoplasm, we found gelsolin both free (empty arrowhead) and somewhat co-localized with actin filaments (arrowhead), whereas it co-localized with actin filaments when near the membrane and cytoplasmic projections (arrow). After the 5 and 12.5 mM BSO treatments, gelsolin was found free in the cytoplasm (empty arrowhead) and co-localized with actin filaments, similar to the control cells (arrowhead). However, near the cell membrane and in the cytoplasmic projections, gelsolin was strongly co-localized with the actin filaments. This co-localization was more evident in the cytoplasmic projections (arrow). Notably, in the BSO treatments, especially with 12.5 mM, free gelsolin was present at the distal ends of the projections (empty arrow). After 48 h in the control cells, gelsolin was distributed in both the cytoplasm and the cytoplasmic projections; some cytoplasmic gelsolin was free (empty arrowhead), whereas it was found co-localized with actin filaments near the cell membrane (arrowhead) and in the cytoplasmic projections (arrow). After 48 h in the 5 and 12.5 mM BSO treatments, gelsolin was distributed in the cytoplasm (empty arrowhead), in the vicinity of the cell membrane (arrowhead) and in the cytoplasmic projections (arrow). Its co-localization with actin

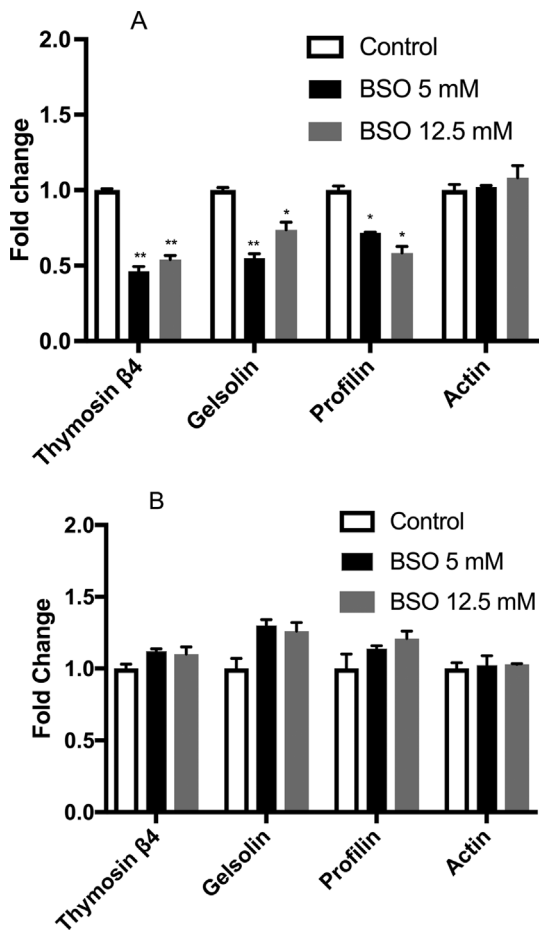


Figure 4 - Gene expression. (A) Gene expression in MSN cells treated with 5 and 12.5 mM BSO for 24 h (black and grey bars, respectively). (B) Gene expression in MSN cells treated with 5 and 12.5 mM BSO for 48 h (black and grey bars, respectively). The bars represent fold changes versus the control (open bars); all control values are set to 1. All data were previously normalized to the housekeeping gene *RPL32*. Statistical significance was determined by Student's *t*-test. * $p < 0.05$. Experiments were performed three times.

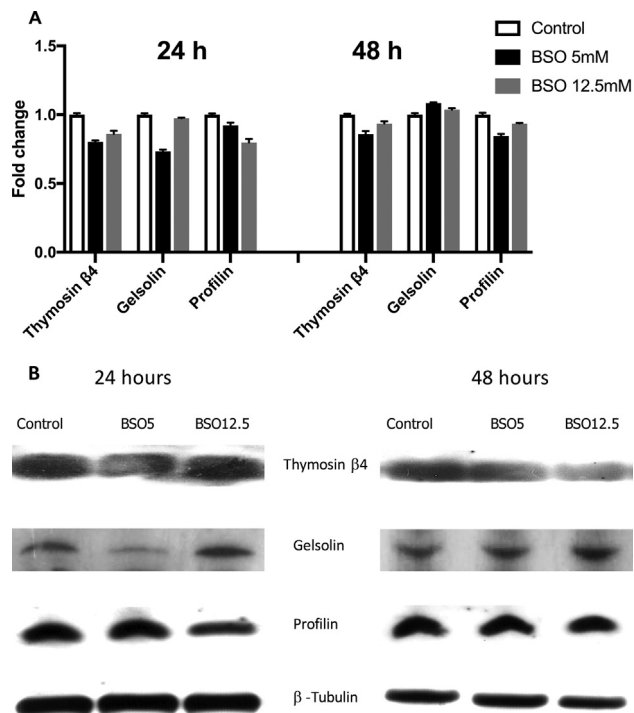


Figure 5 - Protein expression. (A) Protein expression in MSN cells treated with 5 and 12.5 mM BSO for 24 h and 48 h (black and grey bars, respectively). (B) Representative western blots of MSN cells treated with 5 and 12.5 mM BSO for 24 h and 48 h (black and grey bars, respectively). The bars represent fold changes versus the control (open bars); all control values are set to 1. All data were previously normalized to the β -tubulin. Experiments were performed three times.

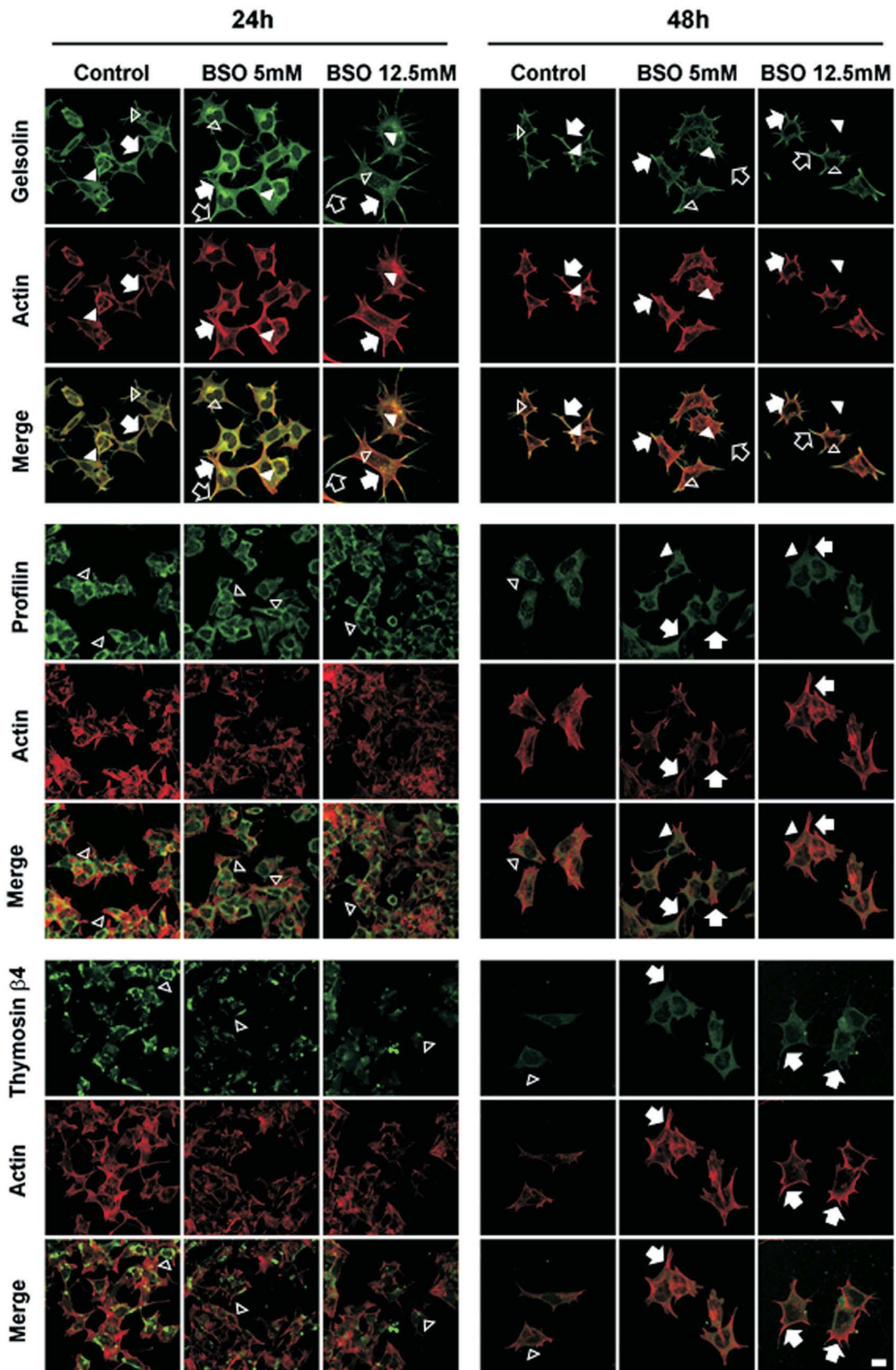


Figure 6 - Cell distribution of the actin-binding proteins gelsolin, profilin and thymosin β 4. Gelsolin was stained with mouse anti-Gelsolin/FITC-goat anti-mouse (green), Profilin was stained with rabbit anti-Profilin/FITC-goat anti-rabbit (green), Thymosin β 4 was stained with goat anti-Thymosin β 4/FITC-rabbit anti-goat (green) and actin filaments were stained with Alexa Fluor® phalloidin (red), 40X. Arrows: lamellipodia; arrowheads: filopodia; empty arrow: cone shape; empty arrowheads: cytoplasmic projections and dot-shaped structures.

filaments was more evident in the cytoplasmic projections, where it strongly co-localized with the actin filaments (arrow). Similar to the 24 h treatments, free gelsolin was present at the distal end of the cytoplasmic projections or filopodia (empty arrow).

After 24 h of treatments, profilin showed a similar distribution in both the control cells and the cells treated with 5 and 12.5 mM BSO. Profilin was confined in the cytoplasm located away from the cell membrane and did not co-localize with the actin filaments (empty arrowhead). After 48 h of treatment, the control cells exhibited the same behavior, with the protein confined to the cytoplasm without reaching the region of the cytoplasmic membrane (empty arrowhead). In contrast, the distribution of the protein became more widespread in the cells treated with 5 and 12.5 mM BSO (arrowhead), even reaching the cell membrane and co-localizing with actin filaments (arrow).

Thymosin β 4 distribution in the control cells was restricted to the cytoplasm, and no co-localization with actin filaments was observed (empty arrowhead), after 24 h of 5 and 12.5 mM BSO treatments, Thymosin β 4 also showed the same distribution in the cytoplasm as the control cells (empty arrowhead). After 48 h of treatment, thymosin β 4 in the control cells was distributed in the cytoplasm (empty arrowhead). However, after treatment with 5 and 12.5 mM, the distribution of thymosin β 4 reached the cytoplasmic projections and was co-localized with the actin filaments (arrow).

Discussion

Considering the essential role of glutathione in physiological cell functions and from the predictions obtained from genomic analysis in GCS-2 cells, unable to synthesize GSH (Rojas *et al.*, 2003; Valverde *et al.*, 2006), it was shown that the remodeling of the actin cytoskeleton and accessory pathways are regulated by the tripeptide. To test this hypothesis we evaluated the role of GSH in regulating the actin cytoskeleton in neuroblastoma MSN cells. We assessed the 5 and 12.5 mM BSO concentrations, which depleted GSH by 70% but did not affect cell viability at 24 or 48 h. These results show that MSN cells are more sensitive to GSH depletion than other tissues (such as those in the kidney or liver) and agree with previous research (Stabel-Burow *et al.*, 1997).

BSO treatment triggers a consistent but not complete GSH depletion. According to the literature, the GSH depletion was partial, suggesting that two pools of GSH are present in MSN cells: one that is easily depleted by BSO and another that is more resistant to depletion (Chen *et al.*, 2005). This finding supported the existence of two sources of GSH.

Having demonstrated the decrease in intracellular GSH levels, we evaluated the redox state in MSN cells after treatment with BSO by measuring the ROS levels and end products of lipid peroxidation. Notably, our aim was to decrease the intracellular GSH level without reaching oxida-

tive stress to determine the role of GSH in regulating the actin cytoskeleton because oxidative stress has already been demonstrated to alter the actin cytoskeleton (Fiaschi *et al.*, 2006; Johansson and Lumberg, 2007; Pierozan *et al.*, 2016).

No changes in the ROS level were found compared to the control condition, suggesting that the depletion of the intracellular GSH level did not induce ROS generation (Table 3). Additionally, we measured lipid peroxidation end products and found that MSN cells treated with 5 and 12.5 mM BSO for 24 h were unable to generate lipid peroxidation end products; in contrast, a slight increase was observed after the 48 h treatment with 12.5 mM BSO. To ensure that the loss of GSH did not induce oxidative stress, we conducted a multiple linear regression analysis to evaluate the influence of ROS and lipid peroxidation due to GSH depletion by BSO treatment on cell viability (Table 4). The analysis showed that neither ROS nor lipid peroxidation appeared to be necessary to predict cell viability.

Thus, the detected ROS and lipid peroxidation levels did not affect cell viability and non-oxidative stress generation could be inferred. This agrees with Franco and Cidowski (2009), as well as Han *et al.* (2007), who support the notion of a direct role for GSH independent from oxidative stress. ROS overload may simply be an epiphenomenon associated with the depletion of GSH.

GSC-2 microarray data and MSN gene and protein expression results confirms that the lack of intracellular GSH modulate the gene expression of thymosin β 4, gelsolin and profilin. We observed an important decrease in the expression of these genes. However, the microarray data indicated only the down-regulation of thymosin β 4 and profilin, while gelsolin was up-regulated. This discrepancy could be due to different cell types used in each study (blastocysts and neuroblasts), or because blastocyst cells were unable to synthesize GSH, with approximately 2% of the normal amount of GSH. Our study never reached the levels of GSH inhibition obtained by previous research (Shi *et al.*, 2000). The same behavior was observed at the protein level, where we observed only a discrete 20% reduction at 24 h that was absent at 48 h.

The confocal microscopy images showed drastic morphological changes in MSN cells when GSH was depleted by BSO treatment. We stained actin filaments and microtubules (another important component of the cytoskeleton) to visualize the distribution of the actin cytoskeleton and, therefore, the cell shape compared to the microtubule distribution. Actin filaments are abundant beneath the plasma membrane, where they form a network and extend throughout the cytoplasm. The control cells showed a characteristic cell shape and were polarized: a lamellipodium and some filopodia were present at one end, while the far end had a cone shape and focal adhesions were present.

The BSO treatments resulted in the loss of the characteristic cell shape and changes in cell polarity. Large cytoplasmic projections were observed along the cell surface,

both lamellipodia and filopodia were present and focal adhesions with a re-localization of thymosin β , gelsolin and profilin proteins were detected. Moreover, the cells contained a neurite-like structure. In this case, the structure resembled an axon due to the neuronal origin of the MSN cells. These observations agree with our previous results (Ramos-Espinosa *et al.*, 2012) and with Mollinari *et al.* (2009), which showed enhanced neurite outgrowth accompanied by increased focal adhesions due to the down-regulation of thymosin β 4.

To visualize the changes described above, we used the image processing package Fiji to analyze 25 representative images of the cell shapes in the control and BSO-treated cells. The predominant cell shapes in the control conditions were polarized with a lamellipodium, with filopodia present at one end, whereas the far end had a cone shape. However, the different BSO treatments resulted in the constant and evident loss of the characteristic cell shape, dramatic polarity changes, more evident cytoplasmic projections, the presence of either lamellipodia or filopodia and in some cases filopodia that resembled an axon that gave the cell a neuron-like cell shape. The drastic changes induced by the BSO treatments went beyond the ultra-structure of the actin cytoskeleton. Notably, we found that GSH depletion could alter the regulation of actin cytoskeleton dynamics, thereby causing the formation of neurites in cultured MSN cells. Notably, these changes did not occur in an undifferentiated cell culture, eliminating a possible effect of BSO *per se*. The neurite formation process is regulated in complex ways. Its growth and guidance depend on well-coordinated cytoskeletal dynamics and occur in conjunction with differentiation and plasticity processes (Wilson *et al.*, 2016). Thus, these results suggest that a decrease in the intracellular GSH content can affect processes involved in the signaling pathway that regulates neurite growth (Bradke and Dotti, 2000a,b; Luo, 2002; Madduri *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2016).

In conclusion, GSH depletion produced a down-regulation of the actin binding proteins profilin, thymosin β 4 and gelsolin after 24 h BSO treatments. This down-regulation appears to be sufficient to trigger important changes in their localization and cellular shape in a non-oxidative stress-dependent manner. These results are relevant because exposures to xenobiotics could decrease the levels of GSH and could represent a cofactor that triggers changes in the cytoskeleton to facilitate the acquisition of several disease hallmarks including those related to cancer and neurodegenerative diseases.

Acknowledgments

We thank Dr. Miguel Tapia from the Unidad de Microscopia del Instituto de Investigaciones Biomédicas for his confocal technical assistance and helpful comments. This work was supported by PAPIIT (IN214410). NZF is a recipient of the CONACyT scholarship 231665 and gratefully acknowledges the Programa de Doctorado en Cien-

cias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. This publication is part of his doctoral thesis. We thank the technical support of Dr. Maria Alexandra Rodríguez-Sastre.

References

- Abemayor E and Sidell N (1989) Human neuroblastoma cell lines as models for the *in vitro* study of neoplastic and neuronal cell differentiation. *Environ Health* 80:3–15.
- Arias C, Sharma N, Davies P and Shafit-Zagardo B (1993) Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J. Neurochem* 61:673–682.
- Bains JS and Shaw C (1997) Neurodegenerative disorders in humans: The role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev* 25:335–358.
- Becker A and Soliman KF (2009) The role of intracellular glutathione in inorganic mercury-induced toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochem Res* 34:1677–1684.
- Birbach A (2008) Profilin, a multi-modal regulator of neuronal plasticity. *BioEssays* 30:994–1002.
- Bouaïcha N and Maatouk I (2004) Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 148:53–63.
- Bradke F and Dotti CG (2000a) Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Curr Biol* 10:1467–1470.
- Bradke F and Dotti CG (2000b) Establishment of neuronal polarity: Lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol* 10:574–581.
- Browne RW and Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347–352.
- Camera E and Picardo M (2002) Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781:181–206.
- Chen HHW and Tien Kuo M (2010) Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy. *Metal-based Drugs* 430939-7.
- Chen J, Small-Howard A, Yin, A and Berry MJ (2005) The responses of Ht22 cells to oxidative stress induced by buthionine sulfoximine (BSO). *BMC Neurosci* 6:10.
- Cui X, Zhang S, Xu Y, Dang H, Liu C, Wang L, Yang L, Hu J, Liang W, Jiang J, *et al.* (2016) PFN2, a novel marker of unfavorable prognosis, is a potential therapeutic target involved in esophageal squamous cell carcinoma. *J Translat Med* 14:137.
- Dedova IV, Nikolaeva OP, Safer D, De La Cruz EM and dos Remedios CG (2006) Thymosin beta4 induces a conformational change in actin monomers. *Biophys J* 90:985–992.
- Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progr Neurobiol* 62:649–671.
- Fiaschi T, Cozzi G, Raugei G, Formigli L, Ramponi G and Chiarugi P (2006) Redox regulation of beta-actin during integrin-mediated cell adhesion. *J Biol Chem* 281:22983–22991.
- Franco R and Cidlowski J (2009) Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. *Cell Death Diff* 16:1303–1314.
- Fu X, Cui P, Chen F, Xu J, Gong L, Jiang L, Zhang D and Xiao Y (2015) Thymosin β 4 promotes hepatoblastoma metastasis

- via the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Med Rep* 12:127-132.
- Han YH, Kim SZ, Kim SH and Park WH (2007) Apoptosis in pyrogallol-treated Calu-6 cells is correlated with the changes of intracellular GSH levels rather than ROS levels. *Lung Cancer* 59:301-314.
- Hartmann A and Speit G (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 90:183-188.
- Hertzog M, van Heijenoort C, Didry D, Gaudier M, Coutant J, Gigant B, Didelot G, Pr at T, Knossow M, Guittet E and Carlier MF (2004) The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. *Cell* 117:611-623.
- Huang DW, Sherman BT and Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene list using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 4:44-57.
- Johansson M and Lundberg M (2007) Glutathionylation of beta-actin via a cysteinyl sulfenic acid intermediary. *BMC Biochem* 8:26.
- Kedrin D, van Rheenen J, Hernandez L, Condeelis J and Segall JE (2007) Cell motility and cytoskeletal regulation in invasion and metastasis. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* 12:143-152.
- Kleinman WA and Richie Jr JP (1995) Determination of thiols and disulfides using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 72:73-80.
- Ko L, Odawara T and Yen SH (1997) Menadione-induced tau dephosphorylation in cultured human neuroblastoma cells. *Brain Res* 760:118-128.
- Lee CW, Vitriol EA, Shim S, Wise AL, Velayutham RP and Zheng, JQ (2013) Dynamic localization of G-actin during membrane protrusion in neuronal motility. *Curr Biol* 23:1046-1056.
- Lee VM, Quinn P, Jennings S and Ng L (2003) NADPH oxidase activity in preeclampsia with immortalized lymphoblasts used as models. *Hypertension* 41:925-931.
- Li C and Wong WH (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 31-36.
- Lorente G, Syriani E and Morales M (2014) Actin filaments at the leading edge of cancer cells are characterized by a high mobile fraction and turnover regulation by profilin I. *PLoS One* 9:e85817.
- Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-635.
- Madduri S, Papalozos M and Gander B (2009) Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vitro. *Neurosci Res* 65:88-97.
- McMurray CT (2000) Neurodegeneration: Diseases of the cytoskeleton? *Cell Death Diff* 7:861-865.
- Mollinari C, Ricci-Vitiani L, Pieri M, Lucantoni C, Rinaldi AM, Racaniello M, De Maria R, Zona C, Pallini R, Merlo D and Garaci E (2009) Downregulation of thymosin β 4 in neural progenitor grafts promotes spinal cord regeneration. *J Cell Sci* 122:4195- 4207.
- Pierozan P, Biasibetti H, Schmitz F, Avila H, Fernandes CG, Pesoa-Pureur R and Wyse AT (2016) Neurotoxicity of methylmercury in isolated astrocytes and neurons: the cytoskeleton as a main target. *Mol Neurobiol* 54:5752-5767.
- Ramaekers F and Bosman F (2004) The cytoskeleton and disease. *J Pathol* 204:351-354.
- Ramos-Espinosa P, Rojas E and Valverde M (2012) Differential DNA damage response to UV and hydrogen peroxide depending of differentiation stage in a neuroblastoma model. *Neurotoxicology* 33:1086-1095.
- Reynolds CP, Biedler JL, Spengler BA, Reynolds DA, Ross RA, Frenkel EP and Smith RG (1986) Characterization of human neuroblastoma cell lines established before and after therapy. *J Natl Cancer Inst* 76:375-387.
- Rojas E, Shi ZZ, Valverde M, Paules RS, Habib GM and Lieberman MW (2003) Survival and changes in gene expression in cells unable to synthesize glutathione. *BioFactors* 17:13-19.
- Sch agger H (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 1:16-22.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld A, Schmid B *et al.* (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676-682.
- Shi ZZ, Osei-Frimpong J, Kala G, Kala SV, Barrios RJ, Habib GM, Lukin DJ, Danney CM, Matzuk MM and Lieberman MW (2000) Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5101-5106.
- Siddik ZH (2003). Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265-7279.
- Stabel-Burow J, Kleu A, Schuchmann S and Heinemann U (1997) Glutathione levels and nerve cell loss in hippocampal cultures from trisomy 16 mouse- a model of Down syndrome. *Brain Res* 765:313-318.
- Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M and Yin HL (1999) Regulatory protein. *J Biol Chem* 274:33179-33182.
- Valverde M, Rojas E, Kala SV, Kala G and Lieberman MW (2006) Survival and cell death in cells constitutively unable to synthesize glutathione. *Mutat Res* 594:172-180.
- Wang D and Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4:307-320
- Wilson C, Terman JR, Gonzalez-Billault C and Ahmed G (2016) Actin filaments - a target for redox regulation. *Cytoskeleton* 73:577-595.
- Winder SJ and Ayscough KR (2005) Actin-binding proteins. *J Cell Sci* 118:651-654.
- Ying GX, Liu X, Wang WY, Wang Y, Dong JH, Jin HF, Huang C and Zhou CF (2004) Regulated transcripts in the hippocampus following transections of the entorhinal afferents. *Biochem Biophys Res Commun* 322:210-216.

Associated Editor: Carlos F.M. Menck

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.