

COMUNICACIONES BREVES

Aumento de la expresión de la enzima glutatión sulfur transferasa en *Caenorhabditis elegans* en respuesta a paraquat: estrategia antioxidante con N-acetilcisteína

Increased expression of the enzyme glutathione sulfur transferase in *Caenorhabditis elegans* in response to paraquat: An antioxidant strategy with N-acetylcysteine

Gonzales-Moreno, Candelaria^{1,2}; González-Araujo, Lara²; Ferreyra, Melisa Rut²; Moran, Yanina Soledad^{1,2}; Martínez, Samanta Andrea²; Fernández-Hubeid, Lucía²; Virgolini, Miriam Beatriz*^{1,2}

¹IFEC-CONICET. ²Departamento de Farmacología Otto Orsingher, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

*miriam.virgolini@unc.edu.ar

Recibido: 3 de abril de 2025

Aceptado: 16 de junio de 2025

Editor: Adolfo Rafael de Roodt

Resumen. A pesar de que el paraquat (PQ) es un herbicida ampliamente utilizado en agricultura y permitido en Argentina, su aplicación indiscriminada ha generado preocupación sobre los riesgos para el ser humano y el medio ambiente dentro del enfoque de “Una Sola Salud”. Su toxicidad se debe a la alteración del ciclo redox del glutatión (GSH) y la inducción de disfunción mitocondrial, lo que conduce a muerte celular. En este contexto, las enzimas antioxidantes y las detoxificantes de fase II como glutatión sulfur transferasas (GSTs) y el GSH actúan en concierto para mantener la homeostasis redox. Así, el presente trabajo propone la determinación de la expresión proteica de GST como un biomarcador de efecto a tóxicos como el PQ en el organismo modelo *Caenorhabditis (C.) elegans*. Más aún, se presentan aquí evidencias que aportan a datos ya existentes sobre el uso del antioxidante sintético N-acetilcisteína (NAC) como una estrategia terapéutica para mitigar o prevenir los efectos tóxicos del PQ. Los resultados demuestran que la exposición a PQ 5 mM durante 24 h aumenta la expresión de GST en todo el cuerpo del gusano y que la exposición a NAC 0,5 mM la restituye parcialmente respecto a los animales control. Estos resultados posicionan a *C. elegans* como una nueva aproximación metodológica (NAM) por su relevancia experimental en la valoración de la toxicidad de PQ y otras sustancias, así como su versatilidad para el desarrollo y validación de estrategias terapéuticas basadas en mecanismos de daño tóxico.

Palabras clave: Paraquat; Glutatión; *Caenorhabditis elegans*.

Abstract. Although paraquat (PQ) is a widely used herbicide in agriculture and is permitted in Argentina, its indiscriminate application has raised concerns about the risks to humans and the environment within the One Health approach. Its toxicity is due to the alteration of the glutathione (GSH) redox cycle and the induction of mitochondrial dysfunction, leading to cell death. In this context, antioxidant and phase II detoxifying enzymes such as glutathione sulfur transferases (GSTs) and GSH act in concert to maintain redox homeostasis. Thus, the present work proposes the determination of GST protein expression as a biomarker of effect to toxicants such as PQ in the model organism *Caenorhabditis (C.) elegans*. Furthermore, evidence is presented here that contributes to existing data on the use of the synthetic antioxidant N-acetylcysteine (NAC) as a therapeutic strategy to mitigate or prevent the toxic effects of PQ. The results demonstrate that exposure to 5 mM PQ for 24 h increases GST expression throughout the worm's body, and that exposure to 0.5 mM NAC partially restores it compared to control animals. These results place *C. elegans* as a new methodological approach (NAM) due to its experimental relevance in assessing the toxicity of PQ and other substances, as well as its versatility for the development and validation of therapeutic strategies based on mechanisms of toxic damage.

Keywords: Paraquat; Glutathione; *Caenorhabditis elegans*.

INTRODUCCIÓN

El paraquat (PQ) (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es un herbicida no selectivo de contacto, desarrollado a principios de los años 60 por Syngenta. Su uso en la Argentina data de 1967 y cuenta hasta el presente con el permiso del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (Senasa). En humanos la exposición aguda a PQ produce toxicidad pulmonar, mientras que su exposición crónica resulta en daño en los ganglios basales que se manifiesta como parkinsonismo asociado a la muerte de neuronas dopaminérgicas (Bastías-Candia *et al.* 2019). La toxicidad del PQ ha sido asociada a su capacidad de alterar el balance redox celular mediante la depleción de glutatión (GSH), el desarrollo de peroxidación lipídica y disfunción mitocondrial, lo que condiciona a la célula a contrarrestar este ambiente oxidante (Sharma y Mittal 2024). Además del sistema antioxidante enzimático, uno de los mecanismos detoxificantes con los que cuentan los seres vivos para proteger la integridad celular contra especies reactivas y xenobióticos está representado por las enzimas de biotransformación de fase II denominadas glutatión S-transferasas (GSTs) que median la conjugación del GSH con numerosos sustratos electrofílicos (Xiang *et al.* 2023). De este modo, la alteración en la actividad y/o expresión de estas enzimas detoxificantes podría representar un biomarcador de efecto medible y cuantificable para estimar el daño tóxico inducido por PQ. En base a estas consideraciones, el abordaje terapéutico con antioxidantes como N-acetilcisteína (NAC) ha sido propuesto como una alternativa válida para mitigar y/o prevenir las manifestaciones tóxicas inducidas por PQ (Yeh *et al.* 2006; Gawaramana y Buckley 2011; Tardiolo *et al.* 2018). El nematodo *C. elegans* representa una herramienta única entre los modelos animales por su simplicidad, alta homología con genes de animales superiores, disponibilidad de cepas transgénicas y la descripción completa de su genoma y conectoma (Meneely *et al.* 2019). A pesar de tratarse de un invertebrado y de carecer de algunos órganos como corazón, pulmones, hígado, las características mencionadas determinan su relevancia en la valoración experimental de la toxicidad de xenobióticos como PQ y de posibles intervenciones terapéuticas basadas en su mecanismo de daño tóxico (Hunt 2016). Con el fin de determinar cómo este herbicida afecta la expresión de la enzima detoxificante GST-4 en *C. elegans* y evaluar la eficacia antioxidante de NAC, en el presente estudio se empleó la cepa transgénica CL2166 (dvIs19 [(pAF15)gst-4p:GFP:NLS] III) adquirida en el *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) (<https://cgc.umn.edu/>). La isoforma GST-4 se encuentra en la fibra muscular contráctil del gusano y se expresa en la pared corporal, la hipodermis, las células musculares y

la faringe (WormBase: <https://wormbase.org/search/gene/gst-4p>).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron entre 50-80 gusanos en el estadio larval L4 obtenidos por sincronización de la cepa CL2166, que fueron expuestos en medio líquido a PQ 5 mM o concomitantemente a PQ 5 mM + NAC 0,5 mM por 24 h en agitación a 20 °C. Las concentraciones empleadas se basan en resultados previos de curvas concentración-efecto tanto de PQ como de NAC (Gonzales-Moreno *et al.* 2023). Al finalizar la exposición, los gusanos fueron anestesiados con levamisol 5 mM sobre pads de agarosa a fin de estimar la distribución y expresión proteica de GST-4 mediante la observación de la intensidad de fluorescencia en un microscopio marca Leica - DMI 8 y posterior análisis de las imágenes por el programa Image J (NIH, EE.UU.).

RESULTADOS

Del análisis de los datos (ver *Figura 1*) se desprende que el ambiente prooxidante inducido por PQ produciría un aumento de la expresión de la enzima GST-4 probablemente como mecanismo compensatorio ante el estrés químico inducido por el herbicida, reforzando así el rol de esta enzima en el proceso de detoxificación de PQ asociado a la disponibilidad de GSH. Estos resultados son coincidentes con los reportados por Singhal *et al.* (2011) en los que ratones tratados con una dosis de 10 mg/kg de PQ muestran niveles cerebrales de GST incrementados. En este sentido, en otro estudio se evidenció un aumento en la actividad de GST en varios tejidos de rata expuestos a una dosis de 7,5 mg/kg de PQ (Ray *et al.* 2007). Por el contrario, en presencia de NAC se observó una menor intensidad de fluorescencia, lo que indicaría una reducción de la expresión de la enzima probablemente como consecuencia de la acción concomitante de PQ como un agente pro-oxidante y NAC como antioxidante en un intento del organismo de restablecer el balance redox celular resultante de la presencia de PQ. A este respecto, en resultados previos hemos demostrado que NAC 0,5 mM reduce la mortalidad de *C. elegans* luego de ser administrada en concomitancia con PQ 10-100 mM (Gonzales-Moreno *et al.* 2023). Este efecto podría deberse a la capacidad de NAC de actuar como un antioxidante celular en respuesta a estresores ambientales (Oh *et al.* 2015). Así, dado el rol preponderante de las defensas antioxidantes del organismo, los resultados mostrados en este artículo están siendo complementados con la determinación de la actividad y expresión proteica de

enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, así como de los niveles de GSH, a fin de presentar un perfil completo de las

defensas enzimáticas y no enzimáticas para el mantenimiento de la homeostasis celular en el organismo modelo *C. elegans*.

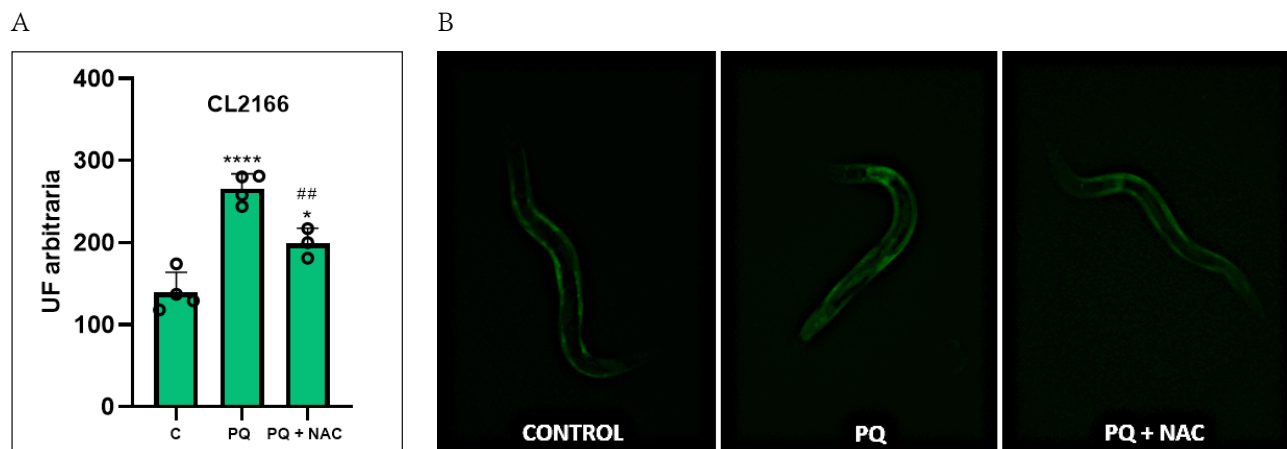


Figura 1. A) Expresión proteica de GST-4 indicada como unidades de fluorescencia arbitrarias en animales control, expuestos a PQ y co-expuestos a PQ + NAC. El ANOVA de una vía demostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en la semicuantificación de la expresión proteica entre los tres grupos estudiados ($n=3-4$ por grupo). *Denota diferencias significativas con respecto al grupo control a $p < 0,001$; #denota diferencias significativas respecto al grupo PQ a $p < 0,05$ (test de Tukey).

B) Imágenes representativas de cada grupo experimental. Escala: 50 μm; magnificación: 60x.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos proveen evidencias del posicionamiento del nematodo *C. elegans* como una herramienta única entre los modelos animales, constituyendo una nueva aproximación metodológica (NAM) alternativa al empleo de roedores en estudios de toxicidad (Hunt 2016). Además, demuestran el rol de GST-4 en el mecanismo molecular del daño tóxico inducido por PQ y aportan evidencias en *C. elegans* de una posible estrategia terapéutica con el antioxidante NAC orientada a mitigar los efectos tóxicos de este herbicida a nivel de esta enzima detoxificante. En vista de las escasas evidencias en *C. elegans* (y en otras especies), experimentos futuros deberían orientarse a determinar la actividad de GST y los niveles de GSH y enzimas antioxidantes del organismo en respuesta al microambiente oxidante inducido por PQ, en particular en el contexto de la teoría que propone un componente ambiental en la etiología de la enfermedad de Parkinson.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses para la publicación del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Bastías-Candia S, Zolezzi JM, Inestrosa NC. 2019. Revisiting the Paraquat-Induced Sporadic Parkinson's Disease-Like Model. *Mol Neurobiol*. 56(2):1044-1055.
- Gawarammana IB, Buckley NA. 2011. Medical management of paraquat ingestion. *Br J Clin Pharmacol*. 72(5):745-57. doi: 10.1007/s12035-018-1148-z. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.04026.x.
- Gonzales-Moreno C, Fernandez-Hubeid LE, Holgado A, Virgolini MB. 2023. Low-dose N-acetyl cysteine prevents paraquat-induced mortality in *Caenorhabditis elegans*. *MicroPubl Biol Mar* 23. doi: 10.17912/micropub.biology.000815.
- Hunt PR. 2016. The *C. elegans* model in toxicity testing. *J Appl Toxicol*. 37(1):50-59.
- Meneely PM, Dahlberg CL, Rose JK. 2019. Working with worms: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 19: e35. doi: 10.1002/cpet.35.
- Oh SI, Park JK, Park SK. 2015. Lifespan extension and increased resistance to environmental stressors

by N-acetyl-L-cysteine in *Caenorhabditis elegans*. Clinics (Sao Paulo). 70(5):380-6. doi: 10.6061/clinics/2015(05)13.

Ray S, Sengupta A, Ray A. 2007. Effects of paraquat on anti-oxidant system in rats. Indian J Exp Biol. 45(5):432-8.

Sharma P, Mittal P. 2024. Paraquat (herbicide) as a cause of Parkinson's Disease. Parkinsonism Relat Disord. 119:105932. doi: 10.1016/j.parkreldis.2023.105932.

Singhal NK, Srivastava G, Patel DK, Jain SK, Singh MP. 2011. Melatonin or silymarin reduces maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. J Pineal Res. 50(2):97-109. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00819.x.

Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. 2018. Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. Molecules. 23(12):3305. doi: 10.3390/molecules23123305.

Xiang X, Wang H, Zhou W, Wang C, Guan P, Xu G, Zhao Q, He L, Yin Y, Li T. 2022. Glutathione Protects against Paraquat-Induced Oxidative Stress by Regulating Intestinal Barrier, Antioxidant Capacity, and CAR Signaling Pathway in Weaned Piglets. Nutrients. 30;15(1):198. doi: 10.3390/nu15010198.

Yeh ST, Guo HR, Su YS, Lin HJ, Hou CC, Chen HM, Chang MC, Wang YJ. 2006. Protective effects of N-acetylcysteine treatment post acute paraquat intoxication in rats and in human lung epithelial cells. Toxicology. 15;223(3):181-90. doi: 10.1016/j.tox.2006.03.019