



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

“Mecanismos epigenéticos asociados a la resistencia a levamisol en el nematodo
Caenorhabditis elegans”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:
Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Alexis Osorio Sánchez

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Querétaro, Qro. a 12 de diciembre 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED


Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional


Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

 **Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

 **NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).

 **SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias Biológicas

“Mecanismos epigenéticos asociados a la resistencia a levamisol en el nematodo
Caenorhabditis elegans”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta:

Alexis Osorio Sánchez

Dirigido por:

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Presidente

Dra. Karina Alethya Acevedo Whitehouse

Secretario

Dra. Etzel Garrido Espinosa

Vocal

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Suplente

Rolando Tenoch Bárcenas Luna

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

12 de diciembre de 2024

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de Querétaro por aceptarme en su programa: Maestría en Ciencias Biológicas.

Al CONAHCYT por financiar mis estudios.

Al Dr. Fausto, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su paciencia, tiempo y disposición.

A cada uno de mis sinodales: Dra. Etzel, Dra. Karina, Dra. Angelina y Dr. Rolando, por su tiempo, paciencia y disposición.

A Iliana y Pepe por haberme enseñado cómo manejar y mantener a mis gusanitos, muchas gracias muchachos.

A Ana por haberme tratado tan bien desde que llegué al laboratorio.

A Julián por su compañía y amabilidad.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE CUADROS.	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	12
I. INTRODUCCIÓN	13
II. ANTECEDENTES	15
2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudio.	15
2.2 Resistencia a antihelmínticos.	16
2.3 Priming o cebado.	18
2.4 Histona metil transferasa WDR-5.	21
2.5 WDR-5 y su importancia en la herencia de resistencia al estrés y la acumulación de lípidos	22
2.6 Importancia de la histona metil transferasa MET-2 en la herencia de longevidad y esterilidad	23
2.7 Mecanismo de ARNi	25
2.8 HRDE-1 y su papel en la herencia de siARN y el silenciamiento transgeneracional	27
2.9 Herencia intergeneracional y transgeneracional.	29
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS.	31
4.1 Objetivo general.	31
4.2 Objetivos específicos.	31

V. METODOLOGÍA	32
5.1 Manejo de cepas de <i>C. elegans</i>	33
5.2 Sincronización y exposición a estrés por levamisol.	33
5.3 Bioensayos para determinar resistencia.	34
5.4 Análisis estadístico.	35
5.5 Manejo y disposición de residuos.	35
VI. RESULTADOS	36
6.1 Primeros bioensayos de resistencia al levamisol.	36
6.2 Herencia intergeneracional y transgeneracional por la exposición inicial a levamisol 40µM en la cepa silvestre <i>N2</i>	38
6.3 Generación de resistencia en la P0.	41
6.4 Resistencia de las distintas cepas a lo largo de 6 progenies.	44
6.5 Herencia de la resistencia en la cepa MT13293 (<i>met-2</i>).	51
6.6 No hay herencia de la resistencia en la cepa RB1304 (<i>wdr-5.1</i>).	55
6.7 Herencia de la resistencia en la cepa <i>hrde-1</i>	59
VII. DISCUSIÓN.	63
7.1 Efecto del cebado con levamisol en la cepa <i>N2</i> de <i>C. elegans</i>	63
7.2 Efecto del cebado con levamisol en todas las cepas de <i>C. elegans</i> durante la P0	64
7.3 Importancia de los mecanismos epigenéticos <i>met-2</i> , <i>wdr-5.1</i> y <i>hrde-1</i> en la herencia intergeneracional y transgeneracional de la resistencia al levamisol.	67
VIII. CONCLUSIONES.	74

IX. PERSPECTIVAS.	75
X. ANEXO.	76
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultado del ANOVA de medidas repetidas de los bioensayos utilizando una concentración de 200, 300 y 400 μ M en la cepa N2: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.	76
Cuadro 2. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para la comparación del porcentaje de parálisis entre la cepa N2 con exposición y sin exposición a lo largo de 6 progenies: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.	76
Cuadro 3. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las cepas a lo largo de 6 progenies: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.	77
Cuadro 4. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa MT13293 con exposición y la cepa N2 con exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.	78
Cuadro 5. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa MT13293 con exposición y la cepa N2 sin exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.	78
Cuadro 6. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa RB1304 con exposición y la cepa N2 con exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.	79
Cuadro 7. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa RB1304 con exposición y la cepa N2 sin exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.	79

Cuadro 8. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa YY538 con exposición y la cepa N2 con exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.
.....79

Cuadro 9. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa YY538 con exposición y la cepa N2 sin exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis.
.....80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología: sincronización, exposición a levamisol 40µM, incubación, generación de progenie y bioensayos a una concentración de 400µM.	34
Figura 2. Bioensayos con una concentración de levamisol de 200, 300 y 400 µM en gusanos adultos de la cepa silvestre N2.	37
Figura 3. Comparación del porcentaje de parálisis de la cepa N2 con y sin exposición a levamisol a lo largo de 6 progenies.	39
Figura 4. Comparación del porcentaje de parálisis de la población parental (P0) de todas las cepas con y sin exposición a levamisol: YY538 (<i>hrde-1</i>), RB1304 (<i>wdr-5.1</i>), MT13293 (<i>met-2</i>) y N2.	41
Figura 5. Comparación del porcentaje de parálisis de la primera progenie (F1) de todas las cepas con y sin exposición a levamisol: YY538 (<i>hrde-1</i>), RB1304 (<i>wdr-5.1</i>), MT13293 (<i>met-2</i>) y N2.	44
Figura 6. Comparación del porcentaje de parálisis de la segunda progenie (F2) de las mutantes <i>hrde-1</i> , <i>met-2</i> y <i>wdr-5.1</i> con exposición con la F2 de la cepa N2 con exposición.	46
Figura 7. Comparación del porcentaje de parálisis de la tercera progenie (F3) de las cepas mutantes YY538 (<i>hrde-1</i>), MT13293 (<i>met-2</i>) y RB1304 (<i>wdr-5.1</i>) con exposición con la F3 de la cepa N2 con exposición.	47
Figura 8. Comparación del porcentaje de parálisis de la cuarta progenie (F4) de las cepas mutantes YY538 (<i>hrde-1</i>), MT13293 (<i>met-2</i>) y RB1304 (<i>wdr-5.1</i>) con exposición con la F4 de la cepa N2 con exposición.	48
Figura 9. Comparación del porcentaje de parálisis de la quinta progenie (F5) de las cepas mutantes YY538 (<i>hrde-1</i>), MT13293 (<i>met-2</i>) y RB1304 (<i>wdr-5.1</i>) con exposición con la F5 de la cepa N2 con exposición.	49

Figura 10. Comparación del porcentaje de parálisis de la sexta progenie (F6) de las cepas mutantes YY538 (*hrde-1*), MT13293 (*met-2*) y RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición con la F6 de la cepa N2 con exposición.50

Figura 11. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de las cepas N2 y MT13293 (*met-2*), ambas con exposición a levamisol 40 μ M.51

Figura 12. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de la cepa N2 sin exposición a levamisol 40 μ M y la cepa MT13293 (*met-2*) con exposición a levamisol 40 μ M.53

Figura 13. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de las cepas N2 y RB1304 (*wdr-5.1*), ambas con exposición.55

Figura 14. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de la cepa N2 sin exposición a levamisol 40 μ M y la cepa RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición a levamisol 40 μ M.....57

Figura 15. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de las cepas N2 y YY538 (*hrde-1*), ambas con exposición.59

Figura 16. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de la cepa N2 sin exposición a levamisol 40 μ M y la cepa YY538 (*hrde-1*) con exposición a levamisol 40 μ M.....61

RESUMEN

La resistencia generada por los gusanos parásitos a los antihelmínticos amenaza las áreas de la agricultura y la salud pública. Existe evidencia que sugiere que mecanismos epigenéticos pueden estar relacionados con dicha resistencia. El objetivo de este trabajo fue determinar si los mecanismos de metilación de histonas H3K9me y H3K4me mediados por las HMT, MET-2 y WDR-5.1 respectivamente, y la proteína argonauta nuclear HRDE-1 están asociados con la resistencia a levamisol en gusanos parentales y en su progenie. Para lograr esto se utilizaron cuatro cepas del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans*: la cepa YY538 posee una deleción en el gen que codifica a la proteína argonauta nuclear HRDE-1; la cepa RB1304 posee una deleción en el gen que codifica a la HMT WDR-5.1; la cepa MT13293 posee una deleción en el gen que codifica a la HMT MET-2 y, la cepa N2 silvestre sirvió como referencia. Cada cepa se sincronizó tomando gusanos adultos grávidos y traspasándolos a cajas Petri previamente preparadas con levamisol a una concentración de 40 μM , se dejó que los gusanos pusieran huevos durante 4 horas, posteriormente se retiró a los gusanos dejando los huevos. Todas las cepas fueron alimentadas con *Escherichia coli* OP50 e incubadas a 20 °C. Se prepararon placas con levamisol a una concentración de 400 μM para realizar bioensayos, de los cuales se obtuvo un porcentaje de parálisis para cada cepa. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de medidas repetidas. La cepa N2 fue significativamente más resistente que las cepas mutantes durante la P0, F2, F3, F5 y F6 ($p < 0.05$), además, pudo heredar la resistencia durante 5 progenies. Los resultados obtenidos sugieren que los tres mecanismos epigenéticos están asociados con la resistencia al levamisol. La cepa RB1304 no fue capaz de heredar resistencia a ninguna progenie y la cepa MT13293 solo pudo heredarla a la F1, además, ambas cepas fueron significativamente más sensibles que la cepa N2 en la mayoría de las progenies ($p < 0.05$); esto sugiere que estos dos mecanismos epigenéticos son de mayor importancia en la resistencia al levamisol y en la herencia de la resistencia.

Palabras clave: *C. elegans*, Priming, proteína argonauta, histona metil transferasa (HMT), epigenética.

ABSTRACT

The resistance generated by parasitic worms to anthelmintics threatens the areas of agriculture and public health. There is evidence suggesting that epigenetic mechanisms may be related to such resistance. The objective of this work was to determine whether the mechanisms of histone H3K9me and H3K4me methylation mediated by HMT, MET-2 and WDR-5.1 respectively, and the nuclear argonaute protein HRDE-1 are associated with levamisole resistance in parental worms and their progeny. To achieve this, 4 strains of the free-living nematode *Caenorhabditis elegans* were used: YY538 “strain” has a deletion in the gene encoding the nuclear argonaute protein HRDE-1; RB1304 “strain” has a deletion in the gene encoding HMT WDR-5.1; MT13293 “strain” has a deletion in the gene encoding HMT MET-2; the wild-type strain N2 served as a reference. Each strain was synchronized by taking gravid adult worms and transferring them to Petri dishes previously prepared with levamisole at a concentration of 40 μ M, the worms were allowed to lay eggs for 4 hours, subsequently the worms were removed leaving the eggs. All strains were fed with *Escherichia coli* OP50 and incubated at 20 °C. Plates were prepared with levamisole at a concentration of 400 μ M for bioassays, from which a percentage of paralysis was obtained for each strain. A repeated measure ANOVA was used for statistical analysis. Strain N2 was significantly more resistant than the mutant strains during P0, F2, F3, F5 and F6 ($p < 0.05$), moreover, it was able to inherit resistance during 5 progenies. The results obtained suggest that all 3 epigenetic mechanisms are associated with levamisole resistance. RB1304 “strain” was not able to inherit resistance to any progeny and strain MT13293 “strain” was only able to inherit it to F1, furthermore, both strains were significantly more sensitive than N2 in most progenies ($p < 0.05$); this suggests that these 2 epigenetic mechanisms are of major importance in levamisole resistance and resistance inheritance.

Keywords: *C. elegans*, Priming, argonaute protein, histone methyl transferase (HMT), epigenetics.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por helmintos tienen gran importancia a nivel mundial, afectan la productividad del ganado y los cultivos, también producen distintas enfermedades en humanos (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001; James et al., 2009; King & Li, 2018). El tratamiento incluye distintos grupos de fármacos como los benzimidazoles, los imidazotiazoles y las lactonas macrocíclicas, denominados antihelmínticos (Kaplan et al., 2004). Actualmente, hay informes de resistencia (en muchas partes del mundo) para estas 3 clases de antihelmínticos, incluido el levamisol, el cual pertenece al grupo de los imidazotiazoles y actúa como agonista del receptor nicotínico de acetilcolina, provocando la despolarización en las membranas de las células musculares, generando parálisis y la muerte en los gusanos (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001; James et al., 2009; Chaya et al., 2021; Holden-dye y Walker, 2007). Los helmintos pueden desarrollar la capacidad de sobrevivir al tratamiento farmacológico con la dosis terapéutica; esto se conoce como resistencia. Hay varios factores asociados con la generación de resistencia: las características genéticas del parásito como mutaciones, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), alelos de resistencia, pueden reducir la afinidad de los fármacos por sus dianas, también pueden generar cambios en el metabolismo, lo que favorece la inactivación y eliminación del fármaco (Kaminsky et al., 2008; Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001; James et al., 2009). La resistencia también puede ser resultado de cambios hereditarios inducidos por la exposición a los antihelmínticos, cambiando los patrones de metilación de genes, lo cual conduce a cambios en la expresión genética en helmintos resistentes (James et al., 2009).

Actualmente, no ha habido gran desarrollo de nuevos antihelmínticos (Kaplan, 2004; James et al., 2009), esto resulta preocupante, ya que la resistencia también está asociada con los tratamientos con regímenes estrictos basados en la administración repetida de los mismos fármacos (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001), por lo cual resulta de gran importancia buscar nuevos tratamientos. A pesar de que se han documentado cambios en la expresión génica en helmintos resistentes (James et al., 2009), ha sido muy poco lo que se ha estudiado

con respecto al papel de la epigenética sobre la resistencia a los antihelmínticos, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si los mecanismos epigenéticos de metilación de histonas MET-2 (histona metiltransferasa específica de la lisina 9 de la histona H3 o H3K9) , WDR-5 (histona metiltransferasa específica de la lisina 4 de la histona H3 o H3K4) y la proteína argonauta nuclear germinal HRDE-1 están asociados con la resistencia a levamisol en gusanos parentales y en la progenie del nematodo de vida libre *C. elegans*. Los mecanismos epigenéticos MET-2 y WDR-5 han sido asociados con la herencia de algunos rasgos en *C. elegans*, tales como una mayor resistencia a agentes estresantes (Kishimoto et al., 2017), longevidad (Lee et al., 2019), esterilidad (Kerr et al., 2014) y acumulación de lípidos (Wan et al., 2022), mientras que la proteína argonauta HRDE-1 ha demostrado estar asociada al silenciamiento transgeneracional de genes (Lev et al., 2017) y la herencia de siARN's (Rechavi, Houry-Zeevi, et al., 2014). No hay estudios que correlacionen algún mecanismo epigenético con la resistencia a levamisol o a algún otro antihelmíntico, y con base en la evidencia previa, estos genes parecen ser buenos candidatos.

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es útil para este tipo de estudios, ya que es capaz de responder a una gran variedad de estímulos ambientales bióticos o abióticos, incluyendo el levamisol (Barnes y Hekimi, 2002; Camacho et al., 2018; Frazier et al., 2019; Willis et al., 2020). Además, *C. elegans* posee similitud genética, fisiológica y morfológica con especies parasitarias; así mismo, posee un ciclo de vida corto, un genoma secuenciado, también es un organismo muy fértil y de fácil manejo en el laboratorio (Simonsen et al., 2014; Stiernagle, 2006). Todas estas características convierten a *C. elegans* en un organismo valioso para estudiar los mecanismos epigenéticos asociados con la resistencia al levamisol.

II. ANTECEDENTES

2.1 *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudio

C. elegans ha sido utilizado para estudiar los mecanismos de acción de distintos grupos de antihelmínticos como los benzimidazoles, las lactonas macrocíclicas y los imidazotiazoles incluido el levamisol. Fue gracias a estudios en cepas mutantes de *C. elegans* que se descubrió que el levamisol actuaba específicamente en los receptores nicotínicos de acetilcolina, denominados L- AchR (Geary & Thompson, 2001; Chaya et al., 2021). *C. elegans* también ha sido utilizado para investigar los mecanismos genéticos asociados a la resistencia a los antihelmínticos mencionados previamente (Driscoll et al., 1989; Geary & Thompson, 2001; Chaya et al., 2021).

El ciclo de vida de *C. elegans* es corto, a los 20 °C, la etapa larval L1 se alcanza en aproximadamente 8 horas, la etapa larval L2 en 18 horas, la etapa larval L3 en 25 horas y la etapa larval L4 en 37 horas. La etapa adulta se alcanza aproximadamente a las 48 horas y la puesta de huevos puede abarcar desde las 58 hasta las 91 horas (Stiernagle, 2006; Porta-De-La-Riva et al., 2012; Weinhouse et al., 2018). *C. elegans* también es un organismo muy fértil, de fácil manejo (tanto del gusano como de las características ambientales) y relativamente más barato que otros modelos (Camacho et al., 2018). El genoma de *C. elegans* está secuenciado, teniendo similitud genética con nematodos parásitos y humanos (Weinhouse et al., 2018; Taki et al., 2014; Yu & Liao, 2016; Moore et al., 2019). *C. elegans* cuenta con un vasto repertorio de cepas mutantes y bibliotecas de ARNi que permiten estudiar distintos procesos biológicos. En *C. elegans* también existe una alta conservación de los mecanismos epigenéticos; así mismo, estos mecanismos (HMT, desmetilasas, acetiltransferasas, desacetilasas, ARN no codificante, complejos que remodelan la cromatina) están muy bien descritos (Weinhouse et al., 2018). También se ha documentado que existe una tendencia semejante entre mamíferos y *C. elegans* por modificar los mismos residuos de lisina, por ejemplo, la lisina 14 y 27 son objetivos recurrentes para la deposición de grupos químicos en ambos, es decir, el patrón de las marcas epigenéticas es muy parecido en algunas regiones

del gen, sobre todo en promotores, difiriendo un poco más en los potenciadores, también el posicionamiento de los nucleosomas es muy parecido (Weinhouse et al., 2018). Otro mecanismo epigenético que se encuentra bastante conservado entre los metazoos son los ARN interferentes pequeños (siARN), existe evidencia de que los siARN también se encuentran conservados entre nematodos y humanos, aunque estos tienden a ser más cortos en los nematodos (Weinhouse et al., 2018).

C. elegans ha sido capaz de responder a diversos factores estresantes ambientales abióticos, como la temperatura, osmolaridad, arsenito, bisfenol-A, metilmercurio, di (2-etilhexil) ftalato; también ha sido capaz de responder a factores bióticos como la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* (Weinhouse et al., 2018; Moore et al., 2019; Camacho et al., 2018; Li et al., 2018; Klosin et al., 2017; Rudgalvyte et al., 2016; Taki et al., 2014; Yu & Liao, 2016). Gracias a su ciclo de vida corto ha sido posible estudiar los efectos generacionales de tales factores estresantes, así mismo, gracias al conocimiento de su genoma y epigenoma, ha sido posible demostrar la importancia de la epigenética en la herencia de los distintos fenotipos causados por factores estresantes.

2.2 Resistencia a antihelmínticos.

Se ha documentado una alta prevalencia de resistencia a antihelmínticos en nematodos que afectan animales, humanos y plantas. Este problema perjudica la productividad del ganado y cultivos (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels 2001; James et al., 2009). La resistencia también afecta al sector salud, las enfermedades producidas por helmintos tienen gran importancia a nivel mundial, siendo las geohelmintiasis (helmintiasis transmitidas por el suelo) una de las más recurrentes, sobre todo en comunidades de escasos recursos. Según la OMS, “alrededor de 1500 millones de personas tienen geohelmintiasis”. Entre los efectos adversos más importantes encontramos la pérdida de peso, que puede derivar en desnutrición y anemia (King & Li, 2018). El tratamiento incluye distintos grupos de fármacos como los benzimidazoles, los imidazotiazoles y las lactonas macrocíclicas. Actualmente, hay informes

de resistencia para estas 3 clases de antihelmínticos en muchas partes del mundo (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001; James et al., 2009).

Hay varios factores que contribuyen a la generación de resistencia. Aparte de las características del parásito, del hospedero y su interacción, se tiene bien documentada una base genética (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001). Se han identificado alelos que confieren resistencia a los gusanos, la frecuencia inicial de estos alelos varía entre las poblaciones de parásitos y aportan una gran ventaja selectiva (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001), también se han documentado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y mutaciones puntuales. Las características genéticas del parásito pueden cambiar la afinidad de unión del fármaco por sus dianas, también pueden generar cambios en la permeabilidad de las membranas y en los sistemas encargados de desintoxicación y metabolismo del fármaco (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001; James et al., 2009)

Otro factor importante para la generación de resistencia son las características del tratamiento: una alta frecuencia y poca variabilidad de los fármacos utilizados puede generar una gran presión de selección (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001). Se ha documentado que la resistencia va en aumento, así mismo, ha habido muy poco desarrollo de nuevos antihelmínticos (Kaplan, 2004; James et al., 2009). Esto sugiere que, en el panorama actual, las opciones son muy limitadas y, teniendo en cuenta que utilizar siempre los mismos fármacos contribuye a la resistencia, resulta importante buscar alternativas. La resistencia también puede ser resultado de cambios hereditarios inducidos por la exposición a los antihelmínticos, cambiando los patrones de metilación de genes, lo cual conduce a cambios en la expresión génica en helmintos resistentes (James et al., 2009). A pesar de que la evidencia sugiere una fuerte asociación entre la epigenética y la resistencia, es muy poco lo que se ha explorado sobre dicha asociación.

La subdosificación también es un factor importante en la generación de resistencia (Geerts & Gryseels, 2001). Teniendo en cuenta la frecuencia inicial de los alelos de resistencia, habrá sujetos dentro de una misma población de parásitos que sean más resistentes a una determinada dosis (Kaplan, 2004; Geerts & Gryseels, 2001; James et al., 2009). Una dosis insuficiente podría promover la supervivencia de los sujetos con un genotipo resistente. Geerts y Gryseels (2001) mencionaron que la subdosificación ocurre, principalmente, por 2 motivos: “dilución del fármaco por razones económicas y el uso de fármacos de calidad inferior”. Existe evidencia de que distintos organismos son capaces de beneficiarse por la exposición a ciertos estímulos ambientales mediante un fenómeno biológico denominado “priming” o “cebado” (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Frazier & Roth, 2009; Kishimoto et al., 2017). La subdosificación plantea un escenario en donde la dosis más baja del antihelmíntico permite al gusano, no solo sobrevivir a la exposición inicial, sino también generar una respuesta más efectiva contra el mismo antihelmíntico.

2.3 Priming o cebado

Muchos organismos están experimentando constantemente diferentes tensiones ambientales, se ha documentado que existe una memoria en los organismos que experimentan estrés biótico o abiótico, dicha memoria les permite preparar una respuesta de duración variable más rápida y robusta, ante un determinado factor de estrés (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Rechavi & Lev, 2017). Esta memoria puede transmitirse a las progenies, haciéndolas más resistentes a las tensiones que experimentaron sus padres (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Harish & Osherov, 2022; Willis et al., 2020). La memoria hacia un determinado estímulo está asociada con la acumulación de moléculas, metabolitos, proteínas y/o modificaciones epigenéticas, así como de su actividad, estabilidad y vida media (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016).

El término “priming” o “cebado” es muy utilizado en el área de biología de estrés de plantas y se utiliza para describir fenómenos que afectan de manera positiva su desempeño (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Conrath et al., 2006). Hilker et al. (2015) definen el “cebado” como “el fenómeno por el cual un estímulo ambiental, temporalmente limitado, prepara y modifica la respuesta a un incidente de estrés futuro”. El término “priming stimulus” o “estímulo cebador” se define como “aquel estímulo que mejora la respuesta de la planta a amenazas inminentes” (Hilker et al., 2015). Conrath et al. (2006) definen el estado “cebado” o “primed” como “una condición fisiológica en la que las plantas son capaces de generar mejores respuestas o respuestas más rápidas de defensas contra el estrés biótico o abiótico”. El término “estímulo desencadenante” o “triggering stimulus” se refiere al “estímulo que activa los rasgos relacionados con la defensa a nivel fenotípico” (Hilker et al., 2015; Martínez-Medina et al., 2016).

Un organismo se encuentra en estado “cebado” o “primed” cuando experimenta un estímulo cebador, en este estado la memoria ya ha sido establecida y está preparada para generar una respuesta más efectiva contra algún estímulo desencadenante (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Conrath et al., 2006; Willis et al., 2020). Este estado implica bajos costos energéticos y su duración depende del tipo de estímulo, del tiempo y la intensidad de la exposición, así como de las características del organismo. Los efectos positivos que experimenta el organismo solo son temporales, es decir, se puede regresar a un estado *naïve* o basal, es decir, el estado previo a la exposición del estímulo cebador (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016).

El éxito del cebado dependerá de las características del organismo y del estímulo (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016). La edad a la que los organismos experimentan el estímulo cebador puede determinar la duración de la memoria y los beneficios contra algún estrés, sobre todo si este tiene grandes probabilidades de presentarse constantemente, ya que el estado cebado es menos costoso que la inducción directa de las respuestas de defensa, los organismos no tienen grandes penalizaciones en su desarrollo y

reproducción, además de estar protegidos contra el estrés (Hilker et al., 2015; Martínez-Medina et al., 2016; Conrath et al., 2006). El estado nutricional del organismo es muy importante, un organismo en inanición probablemente no podrá generar y mantener la memoria, ni responder de manera efectiva ante un estímulo desencadenante (Hilker et al., 2015). La naturaleza, intensidad y frecuencia del estímulo cebador también es muy importante, los organismos tenderán a almacenar y mantener información de aquellas tensiones que tengan mayores probabilidades de ocurrir en un futuro (Hilker et al., 2015).

Los mecanismos moleculares asociados con el cebado son muy variados, se ha documentado la importancia de factores de transcripción, factores de señalización, fitohormonas, proteínas de choque térmico, proteínas quinasas activadas por mitógenos (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Harish & Osherov, 2022; Conrath et al., 2006; Willis et al., 2020). También se han documentado modificaciones epigenéticas, como la remodelación de la cromatina, modificaciones de histonas, cambios en los patrones de metilación del ADN y cambios en la producción de siARN (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Harish & Osherov, 2022; Willis et al., 2020). Tales modificaciones epigenéticas están asociadas con una mayor transcripción de genes que median una mejor respuesta en la generación actual y en la descendencia (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Harish & Osherov, 2022; Conrath et al., 2006).

Cuando el estímulo cebador y el estímulo desencadenante son el mismo, el cebado se denomina cis, cuando son diferentes, se denomina trans (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Harish & Osherov, 2022). El cebado en trans puede explicarse, en parte, por la convergencia de las vías de señalización que se activan con un estímulo cebador específico, por lo que el organismo se nota resistente a otras tensiones también (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022). La naturaleza del estímulo cebador es muy variada, pudiendo ser un estrés biótico o abiótico, una señal ambiental, un compuesto químico, microorganismos o un patógeno (Hilker et al., 2015; Martínez-Medina et al., 2016; Harish &

Oshero, 2022; Conrath et al., 2006). El cebado ha sido observado en plantas, animales, bacterias y hongos (Harish & Oshero, 2022; Conrath et al., 2006; Willis et al., 2020).

Se ha comprobado que el cebado también ocurre en *Caenorhabditis elegans*, nematodos expuestos a factores bacterianos pueden aumentar su resistencia a bacterias patógenas (Willis et al., 2020). También se ha demostrado cebado con temperatura, gusanos expuestos a una temperatura de 25 °C son más resistentes a *Pseudomonas aeruginosa* en comparación con gusanos expuestos a temperaturas más bajas, es decir, cebado en Trans (Zhou et al., 2019). Cebado por estrés osmótico, en donde gusanos expuestos a un medio hiperosmótico (300 mM de NaCl) por 24 horas son más resistentes a un medio con 500 mM de NaCl (cebado en cis), en comparación con gusanos que no recibieron un estímulo cebador (Frazier & Roth, 2009). Cebado por estrés oxidativo, en donde gusanos expuestos a altas concentraciones de NaCl y arsenito son más resistentes a peróxido de hidrógeno y Paraquat (cebado en trans), en comparación con gusanos que no recibieron tal estímulo cebador (Kishimoto et al., 2017).

2.4 Histona metil transferasa WDR-5

La cromatina se puede encontrar en distintos estados de activación transcripcional, los potenciadores activos se caracterizan por el enriquecimiento de la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac) y la monometilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1). Por el contrario, los potenciadores inactivos están enriquecidos con H3K9me3 (Wang et al., 2021; Sze & Shilatifard, 2016; Herz et al., 2012). Estas marcas químicas en las histonas pueden escapar de la reprogramación y ser heredadas a la progenie (Lev et al., 2017).

Los complejos catalíticos tipo MLL3/MLL4 pertenecen a una familia de proteínas llamada lisinas metiltransferasas (KMT), son capaces de generar la activación transcripcional en potenciadores mediante la deposición y eliminación de grupos químicos en las colas de las histonas (Wang et al., 2021; Sze & Shilatifard, 2016; Herz et al., 2012). Para la activación de los potenciadores, el complejo tipo MLL3/MLL4 es capaz de metilar la lisina 4 de la histona H3 (H3K4), también es capaz de mediar la eliminación de las marcas represivas H3K27me3

y H3K9me3 con ayuda de sus subunidades UTX y p300/CBP (Wang et al., 2021; Sze & Shilatifard, 2016; Herz et al., 2012; Kerr et al., 2014; Greer et al., 2010).

El complejo multiproteico WRAD es una subunidad dentro de MLL3/MLL4 y consta de un núcleo formado por las proteínas WDR5, RBBP5, ASH2L, DPY30. Si bien es cierto que WRAD puede contener más proteínas asociadas, el complejo central (del cual forma parte la proteína WDR5) es indispensable para metilar H3K4, mientras que las demás proteínas estarían involucradas en otras funciones, como el reconocimiento de locus genéticos (Wang et al., 2021; Sze & Shilatifard, 2016; Herz et al., 2012; Kerr et al., 2014). La pérdida de alguno de los componentes del complejo WRAD puede desestabilizar MLL3/MLL4 y afectar negativamente la activación transcripcional ya sea por una pérdida en la función catalítica o por alteraciones en los elementos encargados de reconocer y unirse a la cromatina (Sze & Shilatifard, 2016). El silenciamiento de *wdr-5.1* en *C. elegans* reduce los niveles de H3K4me_{2/3} (Kerr et al., 2014; Greer et al., 2011).

2.5 WDR-5 y su importancia en la herencia de la resistencia al estrés y la acumulación de lípidos

Kishimoto et al. (2017) expusieron a hermafroditas de *C. elegans* a arsenito, altas concentraciones de NaCl y ayuno durante la etapa larval L4. Posteriormente, midieron el comportamiento de los gusanos adultos en peróxido de hidrógeno y Paraquat (herbicida que causa estrés oxidativo), encontrando que los animales expuestos fueron más resistentes a dichas condiciones que los gusanos controles. Para estudiar los efectos generacionales se obtuvo progenie a partir de hermafroditas cuyos padres fueron expuestos a condiciones de estrés y las progenies se criaron en condiciones no estresantes, encontrando que las progenies F1, F2 y F3 eran más resistentes al estrés oxidativo que los gusanos control, mostrando que la resistencia al estrés oxidativo puede ser heredada transgeneracionalmente. Utilizando

cepas mutantes, ARNi sistémico y específico de tejido, se determinaron algunos mecanismos subyacentes a esta resistencia y herencia. Una de las conclusiones fue que el silenciamiento de *wdr-5.1* en células germinales disminuyó la resistencia al estrés oxidativo en la progenie F1, mostrando así, su importancia en la herencia de un fenotipo de resistencia (Kishimoto et al. 2017).

Wan et al. (2022) expusieron a *C. elegans* a una dieta alta en grasas, suplementaron el medio de crecimiento de los gusanos con ácido oleico, ácido palmitoleico y colesterol, posteriormente midieron la concentración de lípidos con la técnica “Oil Red O”. Encontraron que la exposición de los gusanos parentales a este medio ocasionaba una acumulación de lípidos en las progenes F1, F2, F3 y F4. Se demostró, también, que el fenotipo obesogénico era mayor en la descendencia, cuyos padres permanecieron un mayor tiempo en una dieta alta en lípidos. Los autores observaron que la pérdida de *wdr-5.1* suprimió la acumulación de lípidos en la progenie, sugiriendo su papel en la herencia del fenotipo obesogénico (Wan et al., 2022).

2.6 Importancia de la histona metil transferasa MET-2 en la herencia de longevidad y esterilidad

La HMT MET-2 se expresa en células germinales y es capaz de mediar la deposición de los dos primeros grupos metilo para formar H3K9me1 y H3K9me2, estas marcas están asociadas a heterocromatina (Rechavi & Lev, 2017; Lev et al., 2017). Los mutantes *met-2* son deficientes para la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) (Lev et al., 2017).

Lee et al. (2019) demostraron que la longevidad de los mutantes *wdr-5.1* (cepa de *C. elegans*) era un rasgo heredado que dependía de la HMT MET-2 y de la marca represiva H3K9me2. Los autores observaron que la longevidad en los mutantes *wdr-5.1* era significativamente mayor a partir de la F20 en adelante (generación tardía), en comparación con una cepa silvestre. Los autores estudiaron los niveles de H3K9me2 global de las cepas *wdr-5.1*, *met-2* y *jhd-1* con inmunotransferencia y *ChIP-seq*. El patrón que observaron fue que H3K9me2

estaba enriquecida cuando la esperanza de vida era mayor, y cuando la esperanza de vida disminuía o se mantenía sin cambios, H3K9me2 también disminuía. Los autores observaron además que la cepa mutante *met-2* (deficiente para H3K9me2) tenía una esperanza de vida más corta en comparación con una cepa silvestre. Al generar mutantes dobles *wdr-5.1; met-2*, observaron que estos no lograron ser longevos. Los autores también estudiaron a la cepa mutante *jhdm-1*, JHDM-1 es una desmetilasa específica de H3K9me2, por consecuencia estos mutantes tenían niveles globales más altos de H3K9me2. Los mutantes *jhdm-1* fueron más longevos que la cepa *wdr-5.1* y esta longevidad iba acompañada de un enriquecimiento global de H3K9me2, además la longevidad se presentaba progenies antes en comparación con la cepa *wdr-5.1*. Los autores tomaron a la última generación *wdr-5.1* longevos y eliminaron a la HMT MET-2, observando que la progenie F3 de estos gusanos había perdido su longevidad, pareciéndose más a una cepa mutante *met-2*. Estos resultados sugirieron que la longevidad era un rasgo que se podría heredar transgeneracionalmente y estaba asociada con H3K9me2 y MET-2 (Lee et al., 2019).

Kerr et al. (2014) estudiaron el fenotipo de mortalidad de las cepas *met-2* y *spr-5* (SPR-5 es una desmetilasa específica de H3K4me2) de *C. elegans*, el cual se caracteriza por un aumento en la esterilidad conforme se alcanzan más progenies. Utilizando CHIP descubrieron que algunos genes de espermatogénesis desregulados en la cepa *spr-5* eran blanco de H3K9me2 depositada por MET-2. También descubrieron que había un enriquecimiento de H3K4me2 en genes de espermatogénesis en ambas cepas a lo largo de las progenies. Utilizando qRT-PCR determinaron que el patrón de expresión en los genes de espermatogénesis era muy parecido en ambas cepas. Debido a que ambas cepas presentaban patrones de metilación, expresión y fenotipos muy parecidos, propusieron que SPR-5 y MET-2 trabajan juntos en un mecanismo de reprogramación epigenética de la línea germinal. Los autores estudiaron a la cepa mutante doble *spr-5; met-2* y observaron que esta se volvía totalmente estéril en una generación, en comparación con las cepas mutantes simples que requerían aproximadamente 30 generaciones para volverse severamente estériles, es decir, se observó un efecto sinérgico en el fenotipo de esterilidad en la cepa mutante doble, también observaron que se incrementó

en gran medida la cantidad de H3K4me2 en genes de espermatogénesis, intestino y músculo en comparación con las cepas mutantes sencillas. Los autores realizaron ChIP en la cepa *wdr-5* y observaron que los niveles reducidos de H3K4me2 en genes diana de SPR-5 y MET-2 se acompañaban de un aumento de H3K9me2. Estos resultados demostraron que existía una retroalimentación entre H3K4me2 y H3K9me2. Los autores propusieron que en ausencia de MET-2 y SPR-5 hay una acumulación de H3K4me2, la cual se hereda transgeneracionalmente y ocasiona una expresión aberrante de genes de la espermatogénesis, lo cual podría explicar la esterilidad (Kerr et al., 2014).

2.7 Mecanismo de ARNi

La interferencia de ARN permite regular la expresión génica. Es un mecanismo de gran importancia para la diferenciación, desarrollo celular y la respuesta contra ácidos nucleicos patógenos (Jin et al., 2021; Ghildiyal & Zamore, 2009; Willis et al., 2020). Este mecanismo se ve ayudado por proteínas argonautas, que unidas a una molécula de ARN pequeña (ARN guía) son capaces de mediar el silenciamiento génico. Los argonautas son capaces de actuar de manera transcripcional, postranscripcional o a nivel nuclear, induciendo heterocromatina (Vasale et al., 2010; Ghildiyal & Zamore, 2009; Jin et al., 2021; Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022; Ding et al., 2023; Ghildiyal & Zamore., 2009).

Dos de los mecanismos más estudiados de interferencia de ARN son los microARN (miARN) y los ARN interferentes pequeños (siRNA), la biogénesis y regulación de estos son diferentes (Vasale et al., 2010; Ghildiyal & Zamore, 2009). Los miARN tienen su biogénesis a partir de locus específicos en el genoma, que pueden ser transcritos por la ARN polimerasa II, se originan en forma de precursores (pri-miARN), que necesitan ser procesados en el núcleo por Drosha (Vasale et al., 2010; Ghildiyal & Zamore, 2009; Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022). Los siARN pueden tener su origen a partir de ARN de doble cadena (dsRNA), estos dsRNA pueden ser de origen exógeno, como en la infección por virus, pero también pueden ser endógenos, es decir, pueden ser transcritos a partir de

transgenes, retrotransposones, regiones intergénicas, pseudogenes, genes codificantes o transcritos aberrantes. (Vasale et al., 2010; Ghildiyal & Zamore, 2009).

Tanto los miARN como los siARN pueden ser procesados en el citoplasma por un complejo multiproteico llamado RLC (Complejo de carga de RISC), que se encarga de ensamblar un complejo RISC maduro (complejo de silenciamiento inducido por ARN), el cual contiene a la proteína argonata correspondiente unida a su ARN guía, ya sea miARN o siARN (Ghildiyal & Zamore, 2009; Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022). Adicionalmente, los dsRNA pueden ser usados como plantillas por polimerasas dependientes de RNA (RdRP) para generar siRNA, que se cargarán en algún argonata (Vasale et al., 2010; Ghildiyal & Zamore, 2009).

Las proteínas argonatas son un componente clave en el silenciamiento génico mediado por ARN. Estas cuentan con 4 dominios que son indispensables para sus funciones biológicas: N-terminal, PAZ (PIWI-AGO-Zwille), MID (Middle) y PIWI (Jin et al., 2021; Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022). Los dominios PAZ y MID interactúan directamente con el ARN guía (Jin et al., 2021; Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022). El dominio PAZ también está involucrado en la integridad del extremo 3' del ARN guía y con la escisión del ARN. El dominio PIWI contiene un pliegue tipo RNasa H con un motivo denominado tétrada catalítica (DEDH/D) y es clave para la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del ARN pasajero y diana (Jin et al., 2021; Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022). El dominio N terminal está asociado a la eyección de la hebra pasajera de la proteína argonata (Iwakawa & Tomari, 2022).

Las proteínas argonata, para llevar a cabo el silenciamiento postranscripcional, pueden unirse a un ARNm diana complementario y escindirlo, esto impide su traducción, posteriormente puede ser degradado por nucleasas (Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022). La complementariedad entre ambas hebras (guía y complementaria) es fundamental para este tipo de silenciamiento (Jin et al., 2021; Ghildiyal & Zamore, 2009).

Se han identificado ciertos segmentos en el ARN guía que son fundamentales para el reconocimiento de su diana. La “región semilla” se encuentra en el extremo 5’, abarca los nucleótidos 2 al 8 del ARN guía, es importante para la unión a la diana y determina el grado de afinidad entre las hebras. La “región central” abarca los nucleótidos 9-12 y es importante para la escisión. La “región suplementaria” está en el extremo 3’, abarca los nucleótidos 13 al 17 y estabiliza la unión entre el complejo. La región de la “cola” abarca el nucleótido 18 hasta el final de la molécula, este segmento se puede asociar con otras proteínas que son capaces de direccionar al complejo RISC a distintos objetivos (Ghildiyal & Zamore, 2009; Jin et al., 2021; Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022).

Muchas proteínas argonauta no tienen actividad de corte, por lo que no todas son capaces de mediar el silenciamiento por escisión del ARNm diana (Ghildiyal & Zamore, 2009; Jin et al., 2021; Tolia & Joshua-Tor, 2006; Iwakawa & Tomari, 2022). Los argonautas sin actividad endonucleasa pueden regular la expresión génica a partir de otros mecanismos como: desestabilización del ARN e inhibición de la traducción (Iwakawa & Tomari, 2022; Ghildiyal & Zamore, 2009; Iwakawa & Tomari, 2022), también existen argonautas capaces de modificar la cromatina al reclutar complejos remodeladores (Ding et al., 2023). La pérdida de las proteínas argonauta suele tener graves consecuencias en el desarrollo de plantas y animales (Ghildiyal & Zamore, 2009).

2.8 HRDE-1 y su papel en la herencia de siARN y el silenciamiento transgeneracional

HRDE-1 es un argonauta nuclear germinal, tiene un papel en la formación de heterocromatina y la amplificación de siARN, los cuales pueden ser heredados a la progenie para mediar el silenciamiento transgeneracional (Ding et al., 2023; Willis et al., 2020; Rechavi, Hourri-Ze’evi, et al., 2014; Rechavi & Lev, 2017). HRDE-1 se encuentra principalmente en el núcleo, pero también se puede encontrar en focos mutadores dentro de nuage (condensados no membranosos perinucleares) (Ding et al., 2023; Willis et al., 2020; Ouyang & Seydoux, 2021), se sugiere que aquí se encarga de la amplificación de siARN, HRDE-1 también es capaz de transportar siARN 22G, los cuales están asociados al

silenciamiento transgeneracional (Ding et al., 2023; Willis et al., 2020; Rechavi, Houriz-Ze'evi, et al., 2014). Se ha documentado una herencia reducida de siRNA's en mutantes *hrde-1*. (Rechavi & Lev, 2017). HRDE-1 también es capaz de reclutar factores encargados de remodelar la cromatina, como NuRD (complejo de remodelación de nucleosomas y desacetilasa) y HMT como SET-25, MET-2 y SET-32. HRDE-1 está asociada con la marca represiva H3K9me3 (Ding et al., 2023).

Rechavi et al. (2014) sometieron a inanición a larvas L1 de las cepas N2 y *hrde-1* de *C. elegans* por 6 días, posteriormente, secuenciaron los siARN's de los gusanos adultos alimentados y sometidos a inanición de ambas cepas. También secuenciaron los siARN's de las progenies de ambas cepas, hasta la F3. Examinaron, por análisis de componentes principales (PCA), si había cambios entre los siARN's de gusanos N2 y *hrde-1* con inanición y alimentados. Determinaron que la inanición genera cambios drásticos en la producción de siARN's 22G endógenos y que estos se heredan a lo largo de 3 progenies. La progenie de la cepa *hrde-1* no alimentada no era capaz de heredar un 96.8% de estos siARN's 22G endógenos. Los autores observaron un incremento significativo en la esperanza de vida en los gusanos N2 que fueron sometidos a inanición, aunque no fue posible asegurar que esto se debía a los cambios en los siANR producidos, aunque existen grandes probabilidades de que así sea. Algunas de las dianas de estos siARN's eran genes asociados con la nutrición, recambio de proteínas, reproducción y longevidad (Rechavi, Houriz-Zeevi, et al., 2014).

Lev et al. (2017) expusieron a las cepas de *C. elegans*: N2, *set-25*, *met-2* y los mutantes dobles *met-2; set-25* (las cuales expresaban un transgén reportero), a bacterias que contenían dsRNA capaces de silenciar a los reporteros. En la cepa N2 detectaron una pérdida gradual del silenciamiento (conforme pasaban las progenies había más gusanos expresando al reportero), en la F6, más del 80% de los animales expresan al reportero. En la cepa *met-2* nunca se pudo detectar la señal del reportero, y se mantuvo así por más de 30 generaciones. Utilizando CRISPR/Cas9, los autores introdujeron una mutación en el gen *hrde-1* de la cepa *met-2*, lo cual originó que los genes reporteros se expresaran nuevamente, lo cual sugirió que

el silenciamiento dependía de los siARN transportados por HRDE-1. Esta observación también se sustentó por los altos niveles de siARN anti reporteros detectados en la cepa *met-2* durante 15 generaciones. Una de las conclusiones fue que el silenciamiento transgeneracional de los reporteros depende de una mayor producción, acumulación y actividad de siARN, también se concluyó que la HMT MET-2 suprime, indirectamente, la síntesis y herencia de siARN's clave para el silenciamiento (Lev et al., 2017).

2.9 Herencia intergeneracional y transgeneracional.

Se habla de herencia intergeneracional cuando un rasgo (en este caso resistencia al levamisol) se hereda a las progenies F1 o F2, es decir, aquellas progenies que estuvieron directamente expuestas a algún estímulo (levamisol en este caso), la F1 estuvo expuesta cuando estaba en el útero, en su etapa de embrión y la F2 son las células germinales de dichos embriones. La herencia transgeneracional ocurre cuando el rasgo se puede observar en aquellas progenies que no estuvieron directamente expuestas al estímulo, es decir, la F3 en adelante (Rechavi & Lev., 2017; Weinhouse et al., 2018).

III. HIPÓTESIS

La exposición a bajas concentraciones de levamisol es capaz de generar gusanos más resistentes a concentraciones más altas del mismo, así mismo, los mecanismos epigenéticos de metilación de histonas MET-2, WDR-5 y la proteína argonauta HRDE-1 están asociados con esta resistencia al levamisol y la herencia de la misma en *C. elegans*.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si la exposición a una baja concentración de levamisol puede funcionar como un estímulo cebador capaz de generar gusanos más resistentes, y demostrar si existe una asociación entre los mecanismos de metilación de histonas MET-2, WDR-5 y la proteína argonauta HRDE-1 con la resistencia al levamisol en gusanos parentales y en la progenie del nematodo *C. elegans*.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar si la exposición única a 40 μM de la P0 es capaz de generar gusanos más resistentes a una concentración de 400 μM .
- Determinar si el mecanismo de metilación de histonas H3K9 mediado por *met-2* está asociado con la resistencia al levamisol en gusanos parentales y en su progenie.
- Determinar si el mecanismo de metilación de histonas H3K4 mediado por *wdr-5.1* está asociado con la resistencia al levamisol en gusanos parentales y en su progenie.
- Determinar si la proteína argonauta nuclear germinal HRDE-1 está asociada con la resistencia al levamisol en gusanos parentales y en su progenie.

V. METODOLOGÍA

Para hacer evidente el mejor desempeño del organismo que experimenta estímulo cebador, es necesario compararlo con un organismo que no haya recibido dicho estímulo, el organismo expuesto es capaz de preparar una respuesta más rápida y/o eficiente contra un estímulo desencadenante (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martínez-Medina et al., 2016; Martínez-Medina et al., 2016). En este estudio se llevó a cabo dicha comparación y se planteó la hipótesis de que la resistencia al levamisol está asociada con los mecanismos epigenéticos de metilación de histonas MET-2, WDR-5 y la proteína argonauta germinal nuclear HRDE-1. Para poner a prueba esta hipótesis se utilizaron 4 cepas del nematodo *Caenorhabditis elegans*: la cepa MT13293 con genotipo *met-2* (n4256), posee una delección en su secuencia codificante R05D3.11, esta delección es de un tamaño de 1343 pb, comienza en la posición 501 de dicha secuencia y termina en la posición 1844 (Sternberg et al., 2024). La cepa RB1304 con genotipo *wdr-5.1* (ok1417), posee una delección de aproximadamente 695 pb dentro de la secuencia codificante del gen *wdr-5.1*, esta delección comienza en la posición 355 y termina en la posición 1050 (Sternberg et al., 2024). La cepa YY538, con genotipo *hrde-1* (tm1200), posee una delección de aproximadamente 374 pb en el gen que codifica a la proteína argonauta nuclear HRDE-1 (Sternberg et al., 2024). La cepa silvestre N2, la cual sirvió como control. Las cepas MT13293 y RB1304 comprometen la integridad de las HMT MET-2 y WDR-5.1 respectivamente. MET-2 es capaz de mediar la deposición de las marcas represivas H3K9me1/2 asociadas a heterocromatina, estudios han demostrado que el silenciamiento de este gen genera niveles reducidos de dichas marcas (Lev et al., 2017; Lee et al., 2019), mientras que WDR-5.1 se encarga de metilar H3K4, marcas asociadas a la activación transcripcional, estudios han demostrado que el silenciamiento de este gen ocasiona niveles reducidos de H3K4me2/3 (Kerr et al., 2014; Greer et al., 2011). La cepa YY538 compromete la integridad del argonauta nuclear HRDE-1, la cual está asociada a la formación de heterocromatina en el núcleo y a la amplificación de siARN, los cuales se encargan de mediar el silenciamiento postranscripcional (Ding et al., 2023; Willis et al., 2020; Houriz-Ze'evi, et al., 2014; Rechavi & Lev, 2017). Este diseño experimental permitió observar el efecto que tiene cada delección sobre la resistencia al levamisol, en un contexto similar, ya que todas las

cepas crecieron bajo las mismas condiciones experimentales y fueron puestas a prueba con la misma concentración de levamisol.

5.1 Manejo de cepas de *C. elegans*

Se obtuvieron las cepas N2, RB1304(*wdr-5.1*), YY538(*hrde-1*) y MT13293(*met-2*) del Centro de Genética Caenorhabditis. Todas las cepas fueron cultivadas en medio de crecimiento para nematodos (NGM) y se sembraron con 180 μL de *E. coli* tal como describe Brenner (1974). Para preparar cajas con levamisol se disolvió este último en el NGM, se utilizó la fórmula de molaridad para preparar cajas a una concentración de 40 μM y 400 μM . Este proyecto fue sometido y aprobado por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (Clave # 020FCN2023).

5.2 Sincronización y exposición a estrés por levamisol

Se prepararon placas con una concentración de levamisol de 40 μM y se sembraron con 180 μL de *E. coli* OP50. Todas las cepas se sincronizaron tomando adultos grávidos y transfiriéndolos a las placas previamente preparadas con levamisol 40 μM , posteriormente se dejó que pusieran huevos por 4 horas. A continuación, se retiraron a los gusanos y se dejaron solo los huevos, los cuales fueron incubados a 20 °C por 4 días, esta fue la población parental (P0). Para generar la primera progenie (F1) se tomó a los gusanos adultos grávidos (P0) previamente expuestos a 40 μM de levamisol, y se transfirieron a placas sin el antihelmíntico y sembradas con 180 μL de *E. coli* OP50 para que pusieran huevos por 4 horas, posteriormente, se retiró a los gusanos y se dejaron solo los huevos, los cuales fueron incubados a 20 °C por 4 días, esta fue la primera progenie (F1), este proceso se repitió hasta generar la sexta progenie (F6) en todas las cepas.

5.3 Bioensayos para determinar resistencia

Se transfirieron gusanos adultos a las placas con una concentración de 400 μM de levamisol para poner a prueba la resistencia de todas las progenies de cada cepa. Se realizaron 12 réplicas por grupo experimental. Cada réplica corresponde a una placa con 20 gusanos, analizando un total de 240 gusanos por grupo experimental. Para determinar la resistencia de cada grupo, se obtuvo un porcentaje de parálisis (número de gusanos paralizados/gusanos totales) a los 30 minutos y a la primera hora. La parálisis se determinó picando gusanos con un alambre de platino, y se cuantificó como “paralizado” si el gusano no se movía al picarlo. Se compararon estadísticamente los grupos experimentales para determinar cuáles cepas y progenies fueron las más resistentes a lo largo del estudio, esta comparación permitió asociar algún mecanismo epigenético con la resistencia al levamisol, también permitió determinar si existía una herencia intergeneracional o transgeneracional de la resistencia.

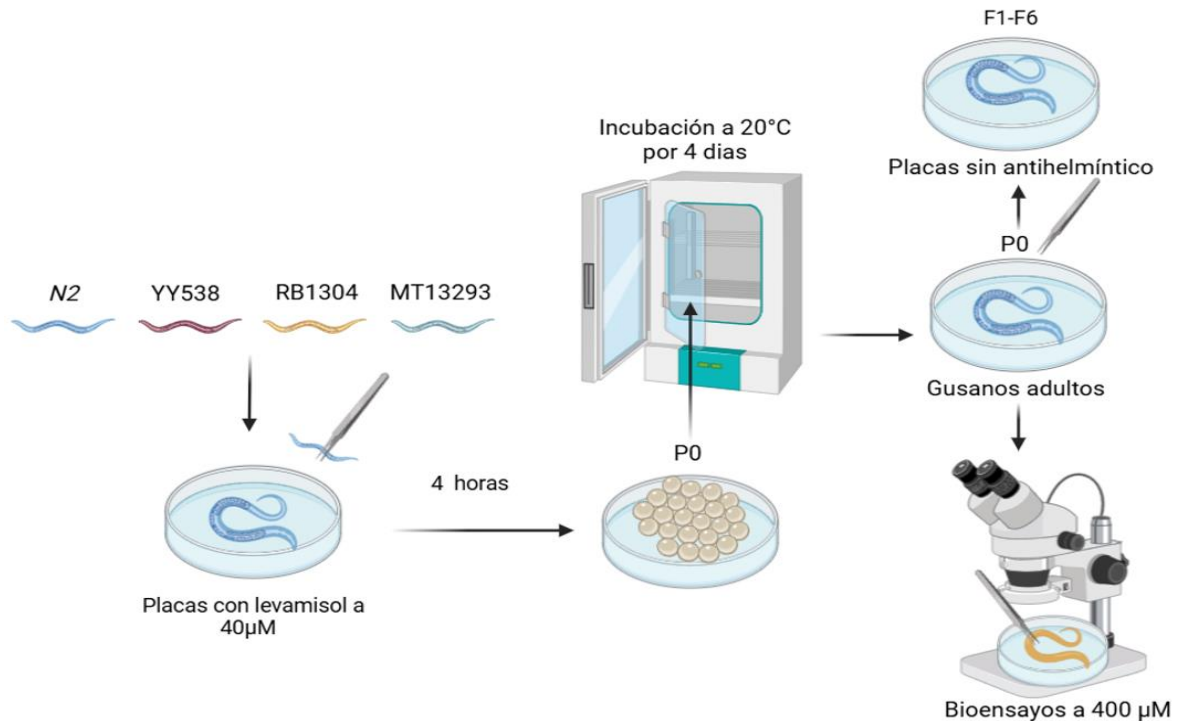


Figura 1. Metodología: Exposición a levamisol 40 μM , sincronización, incubación, generación de progenie y bioensayos a una concentración de 400 μM .

5.4 Análisis estadístico

Los ensayos de resistencia al levamisol se analizaron con un análisis ANOVA mixto de medidas repetidas para determinar si hubo diferencias significativas en alguno de los 2 tiempos (30 minutos y 1 hora) entre los grupos experimentales, también se utilizó la prueba t por pares con el ajuste de Bonferroni para obtener el valor P de significancia estadística. Los análisis estadísticos se realizaron en R versión 2023.6.2.561 (Posit team, 2023) y se utilizaron los paquetes ggplot2 (Wickham, 2016) ggtext versión 0.1.2 (Clauset al, 2022), ggpubr versión 0.6.0 (Kassambara 2023), ggsignif (Constantin et al., 2021), RColorBrewer versión 1.1-3 (Neuwirth 2022), tidyverse (Wickham et al., 2019), rstatix versión 0.7.2 (Kassambara 2023), readr versión 2.1.4 (Wickham et al., 2023), afex versión 1.3-0 (Singmann et al., 2023) y dplyr versión 1.1.2 (Wickham et al., 2023).

5.5 Manejo y disposición de residuos

La disposición y recolección de los RPBI se hizo con base en la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Las cepas de *C. elegans* se manipularon y almacenaron con base en los lineamientos de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

VI. Resultados

6.1 Primeros bioensayos de resistencia al levamisol

La subdosificación es un factor importante para la generación de resistencia a los antihelmínticos (Geerts & Gryseels, 2001), también existe evidencia de que distintos organismos son capaces de beneficiarse de ciertos estímulos ambientales (incluidos estresores ambientales), los cuales les permiten generar una respuesta más efectiva contra algún factor de estrés mediante un fenómeno biológico denominado "cebado" (ver sección 2.3) (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martinez-Medina et al., 2016; Rechavi & Lev, 2017). Con base en esta premisa se expusieron a todas las cepas de *C. elegans* a una baja concentración del antihelmíntico levamisol. Primero se probó el efecto de varias concentraciones de levamisol (200, 300 y 400 μM) sobre el porcentaje de parálisis de gusanos adultos de la cepa N2 a la primera y segunda hora (figura 2).

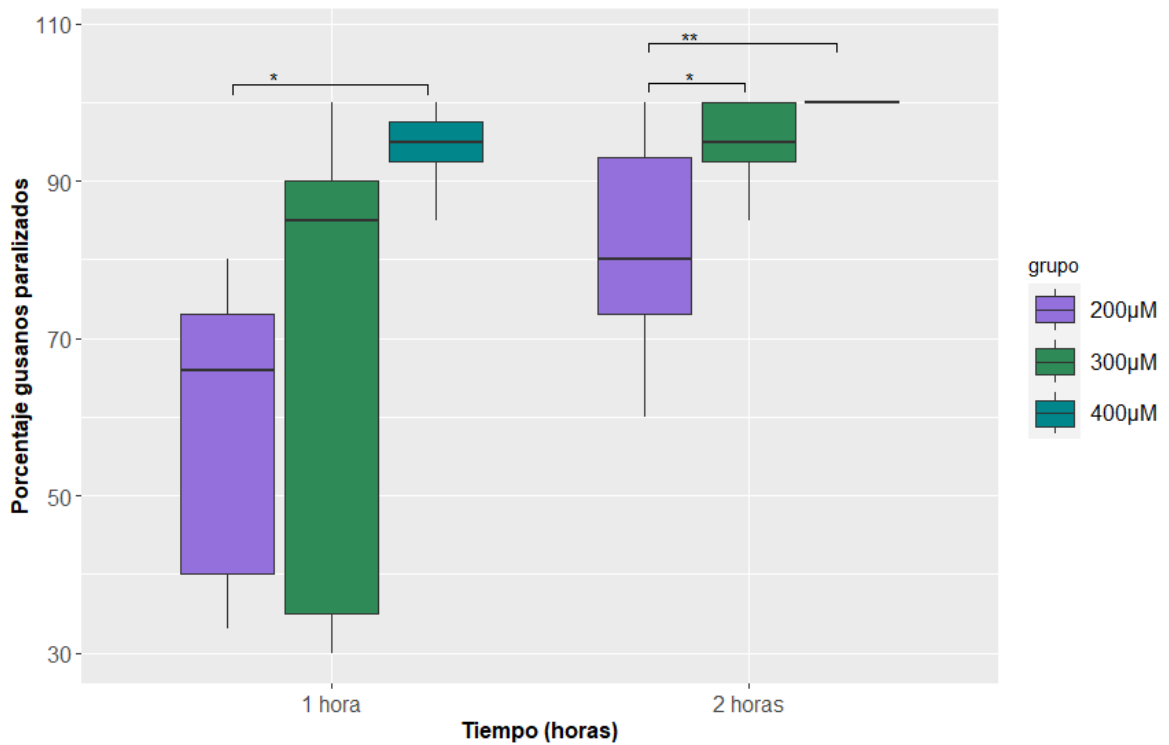


Figura 2. Bioensayos con una concentración de levamisol de 200, 300 y 400 μM en gusanos adultos de la cepa silvestre N2.

Se realizaron 12 réplicas para cada grupo. Las tres concentraciones de levamisol utilizadas están representadas por el color morado (200 μM), verde (400 μM) y azul (300 μM). El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): * <0.05 , ** <0.005 .

En estos bioensayos se realizaron 12 réplicas para cada grupo (cada réplica consta de una placa con 20 gusanos) y se determinó que el porcentaje de parálisis era significativamente mayor a la primera y segunda hora ($P < 0.05$ y $P < 0.005$ respectivamente) con una concentración de 400 μM , en comparación con una concentración de 200 μM . También se pudo observar que el porcentaje de parálisis era ligeramente mayor con 400 μM en comparación con 300 μM , a pesar de que este resultado no fue significativo en ninguno de

los 2 tiempos ($P = 1$ y $P = 0.964$), además, el porcentaje de parálisis con una concentración de 400 μM mostró una menor dispersión de los datos, por lo que se optó por usar esta última concentración para los ensayos de resistencia. Para determinar si una exposición inicial con una concentración 10 veces menor a 400 μM funcionaba como un "estímulo cebador" (ver sección 2.3), todas las cepas se crecieron y se desarrollaron en una concentración de 40 μM de levamisol durante la P0. Este estímulo solo se aplicó una vez y fue para la población parental (P0) de todas las cepas, todas las demás progenies (F1-F6) de todas las cepas crecieron y se desarrollaron en condiciones estándar (sin antihelmíntico), tal como lo describe Brenner (1974). Esto se hizo con la finalidad de determinar si esta exposición inicial al levamisol era capaz de generar gusanos más resistentes a una concentración elevada de levamisol (400 μM), es decir, cebado en cis. Así mismo, se determinó si esta resistencia fue heredada inter o transgeneracionalmente en cada cepa.

Se determinó el porcentaje de parálisis de la cepa N2 (con y sin exposición a levamisol 40 μM) a la primera y segunda hora en una concentración de 400 μM , durante 6 progenies, en estos bioensayos no se detectaron diferencias significativas entre la cepa N2 con exposición y sin exposición a la segunda hora, en ninguna de las 6 progenies (resultados no mostrados), por lo que se optó por medir el comportamiento de todas las cepas en un lapso de tiempo más corto, así que se obtuvieron 2 porcentajes de parálisis para cada grupo experimental, uno a los treinta minutos y el otro a la primera hora. Para determinar la resistencia al levamisol y la herencia de la misma, se compararon los porcentajes de parálisis de cada grupo experimental con la cepa silvestre N2 con y sin exposición en los dos tiempos establecidos.

6.2 Herencia intergeneracional y transgeneracional por la exposición inicial a levamisol 40 μM en la cepa silvestre N2

Se realizaron comparaciones entre grupos que recibieron la exposición inicial a 40 μM de levamisol y aquellos que no la recibieron. Se observó el comportamiento de la cepa silvestre N2 (cepa de referencia) con y sin exposición durante 6 progenies (Figura 3).

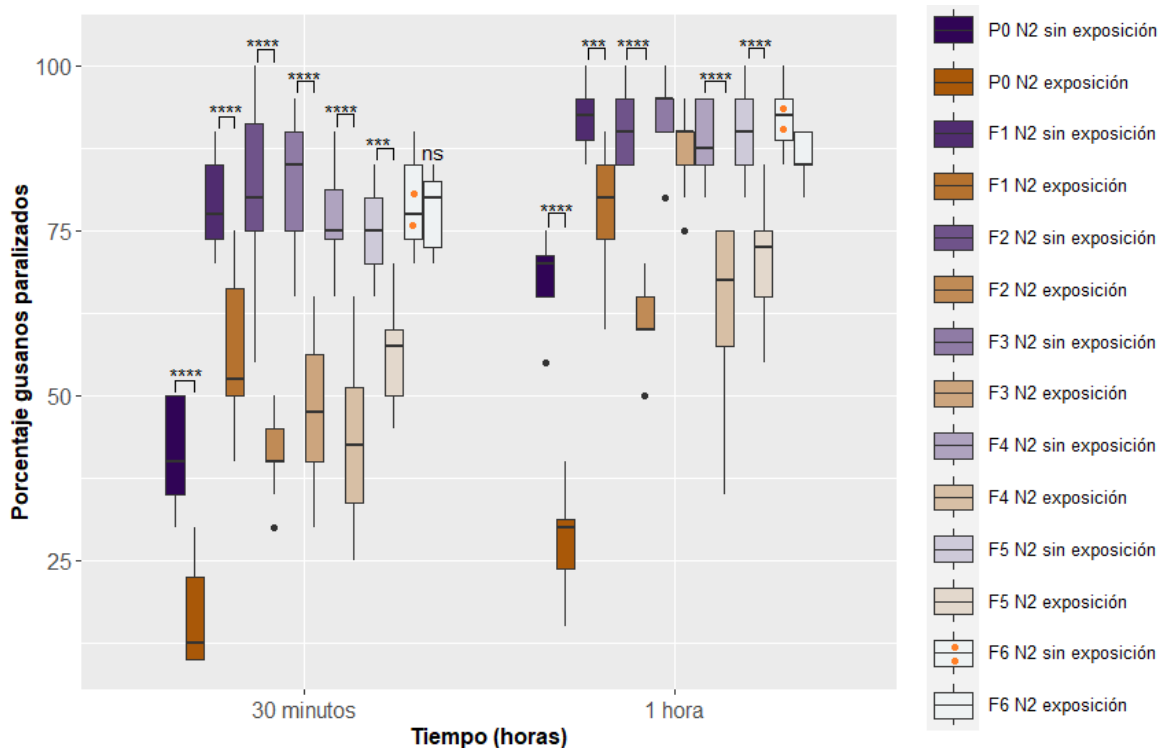


Figura 3. Comparación del porcentaje de parálisis de la cepa N2 con y sin exposición a levamisol a lo largo de 6 progenies.

Se incluyeron 12 réplicas por grupo; todos los bioensayos fueron con una concentración de 400 μ M de levamisol. Los distintos tonos de morado representan a las progenies de la cepa N2 sin exposición, exceptuando a la F6, la cual está representada con blanco y dos puntos naranjas para distinguirla de la F6 con exposición. Los distintos tonos de naranja representan a las progenies de la cepa N2 con exposición, exceptuando a la F6, la cual está representada con blanco. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): ****<math><0.0005</math>, *****<math><0.00005</math>.

La generación parental (P0) N2 que recibió la exposición inicial con levamisol se mostró significativamente más resistente que su contraparte sin exposición a los 30 minutos y a la primera hora ($P < 0.00005$). Las progenies F1, F2, F4 y F5 derivadas de los padres expuestos a levamisol fueron significativamente más resistentes que su contraparte sin exposición a la primera hora y significativamente más resistentes durante la F1, F2, F3, F4, y F5 a los 30 minutos ($P < 0.0005$). No hubo diferencias significativas en la F6 para ambos grupos en ninguno de los dos tiempos. La P0 de la cepa N2 que recibió la exposición al levamisol fue la más resistente a lo largo del estudio. Estos resultados sugieren que la exposición inicial con levamisol a 40 μM funcionó como un “estímulo cebador”, el cual generó gusanos más resistentes, y que este rasgo se pudo heredar inter y transgeneracionalmente en la cepa silvestre N2.

6.3 Generación de resistencia en la P0

Se comparó el porcentaje de parálisis de la P0 de todas las cepas (figura 4).

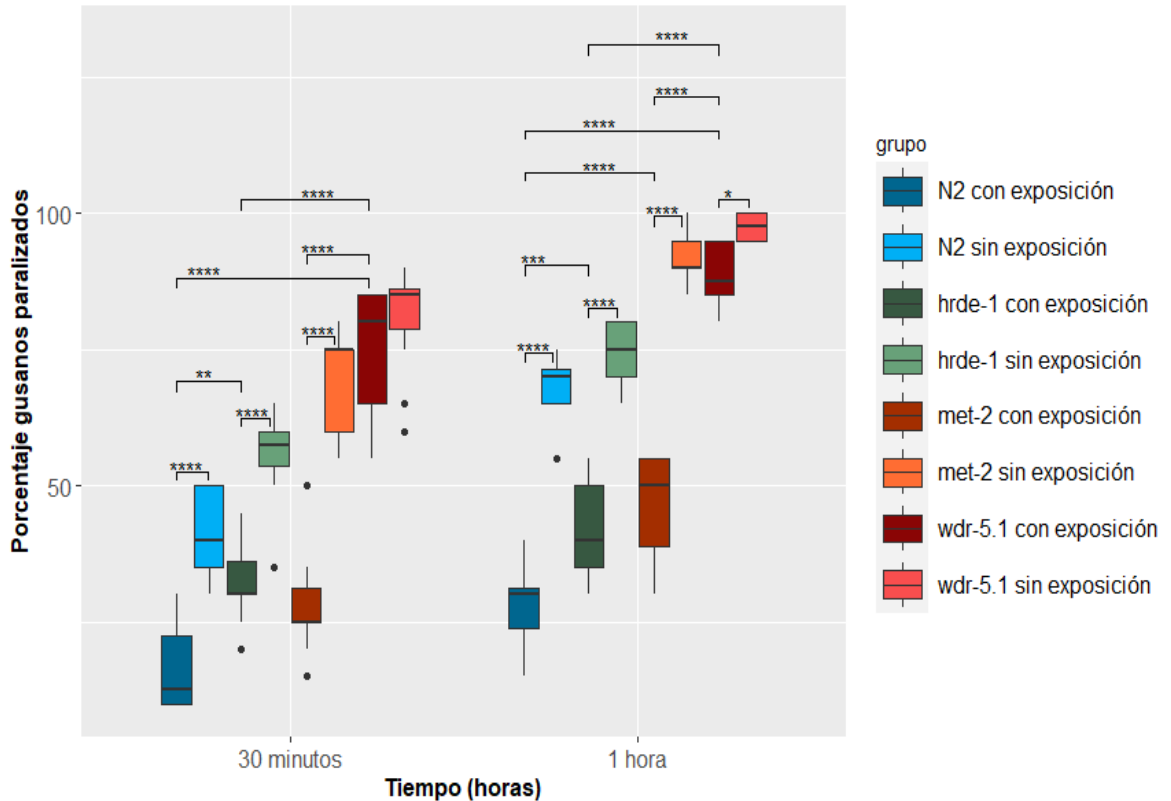


Figura 4. Comparación del porcentaje de parálisis de la población parental (P0) de todas las cepas con y sin exposición a levamisol: YY538 (*hrde-1*), RB1304 (*wdr-5.1*), MT13293 (*met-2*) y N2.

Se incluyeron 12 réplicas por grupo; todos los bioensayos fueron con una concentración de 400 μ M de levamisol. Cada cepa está representada por un color, siendo el tono más oscuro la cepa con exposición. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.00005.

En estos bioensayos se incluyeron cepas que recibieron la exposición a levamisol 40 μM y las mismas cepas, pero sin exposición. Todas las cepas con exposición fueron significativamente más resistentes que su contraparte sin exposición en alguno de los 2 tiempos o en ambos. Las P0 de las cepas N2, YY538 (*hrde-1*) y MT13293 (*met-2*) que recibieron la exposición fueron significativamente más resistentes que su contraparte sin exposición en ambos tiempos ($P < 0.00005$). La cepa RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición fue significativamente más resistente que su contraparte sin exposición solo a la primera hora ($P < 0.05$). La cepa N2 con exposición fue significativamente más resistente que las cepas YY538 ($P < 0.05$) y RB1304 ($P < 0.00005$) con exposición a los 30 minutos, también fue más resistente que la cepa MT13293 a los 30 minutos, aunque el resultado no fue significativo ($P < 0.054$). A la hora, la cepa N2 fue significativamente más resistente que las 3 cepas mutantes con exposición. Todas las cepas con exposición lograron reducir significativamente su porcentaje de parálisis con respecto a su contraparte sin exposición; sin embargo, esta reducción fue mucho menor para la cepa RB1304. La magnitud de la diferencia en el porcentaje de parálisis entre cepas con y sin exposición fue mayor para la cepa MT13293 a los 30 minutos $P < 0.00005$ ($2.31\text{e-}17$) y a la hora $P < 0.00005$ ($9.98\text{e-}28$), es decir, esta cepa mutante fue la que logró reducir más su porcentaje de parálisis con respecto a su contraparte sin exposición, a pesar a que no fue la cepa más resistente. Después de la cepa MT13293, la cepa N2 fue la que logró reducir más su porcentaje de parálisis con respecto a su contraparte sin exposición a los 30 minutos $P < 0.00005$ ($4.61\text{e-}8$) y a la hora $P < 0.00005$ ($1.47\text{e-}23$). Después de estas cepas, se encuentra la cepa YY538 con un valor $P < 0.00005$ ($9.78\text{e-}7$) a los 30 minutos y $P < 0.00005$ ($8.44\text{e-}19$) a la primera hora. La cepa mutante RB1304 fue la que logró la menor reducción en el porcentaje de parálisis con respecto a su contraparte sin exposición, solo a la primera hora $P < 0.05$ ($2.95\text{e-}2$), obteniendo un valor no significativo a los 30 minutos. La cepa RB1304 con exposición resultó ser significativamente más sensible que el resto de cepas con exposición en los 2 tiempos ($P < 0.00005$). Estos resultados sugieren que la exposición inicial con levamisol 40 μM funcionó como un “estímulo cebador” para todas las cepas, ya que generó gusanos más resistentes a una concentración de 400 μM , además, los mecanismos epigenéticos *met-*

2 y *hrde-1* parecen tener una menor relevancia en la generación de gusanos resistentes por el cebado con levamisol en la P0, en comparación con el mecanismo *wdr-5.1*.

6.4 Resistencia de las distintas cepas a lo largo de 6 progenies

Se generó progenie de los padres expuestos y no expuestos a levamisol para cada cepa, hasta 6 progenies, y se comparó su porcentaje de parálisis. En la primera progenie (F1) (Figura 5).

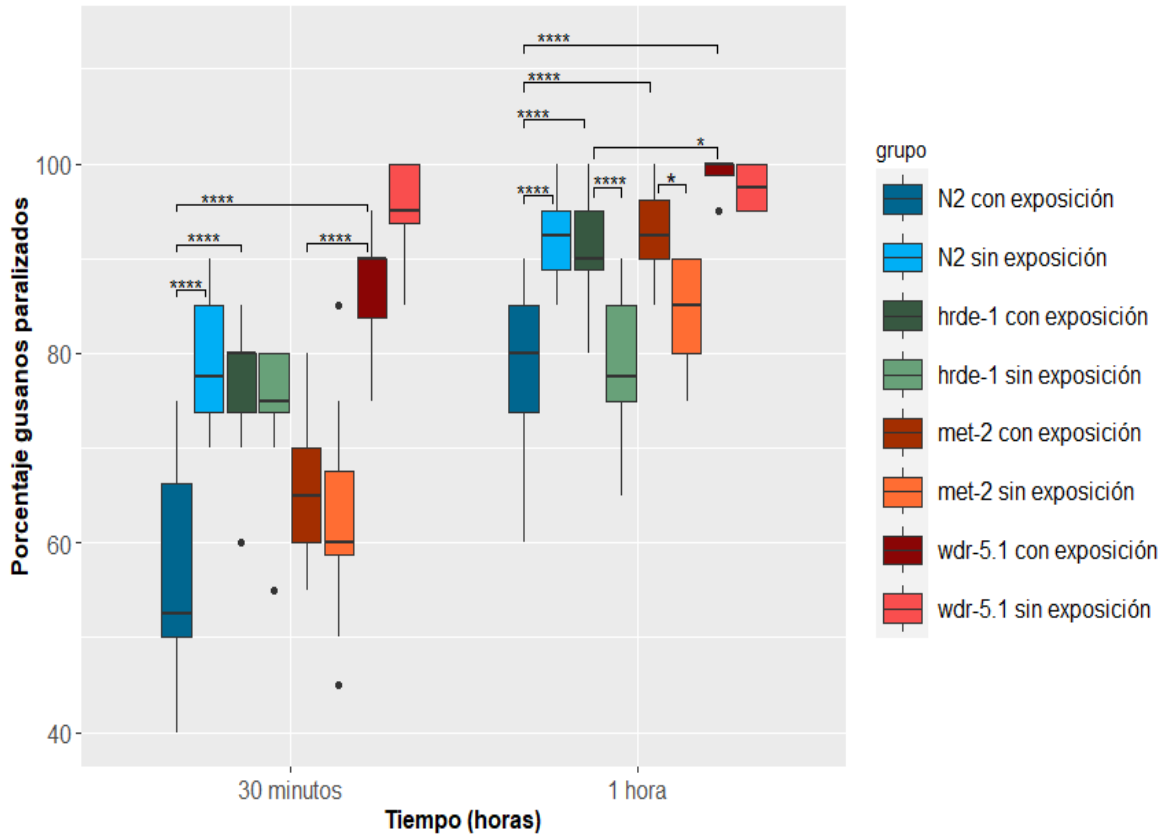


Figura 5. Comparación del porcentaje de parálisis de la primera progenie (F1) de todas las cepas con y sin exposición a levamisol: YY538 (*hrde-1*), RB1304 (*wdr-5.1*), MT13293 (*met-2*) y N2.

Cada cepa está representada por un color, el tono más oscuro representa la progenie derivada de los padres con exposición. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): * < 0.05, **** < 0.00005.

La progenie N2 derivada de la P0 expuesta a levamisol fue más resistente que su contraparte sin exposición en los 2 tiempos ($P < 0.0005$). No hubo diferencias significativas entre ambos

tipos de progenies (expuesta y no expuesta) para las tres cepas mutantes a los 30 minutos. Sin embargo, la progenie derivada de la cepa YY538 sin exposición resultó ser más resistente que su contraparte con exposición a la primera hora ($P < 0.0005$), esto se repitió también con la cepa MT13293 a la primera hora ($P < 0.05$). Al comparar solo las progenies derivadas de padres expuestos, la progenie de la cepa RB1304 fue significativamente más sensible al levamisol que las progenies de las cepas N2 y MT13293 a los 30 minutos ($P < 0.00005$), y a la primera hora fue significativamente más sensible que las progenies de las cepas YY538 ($P < 0.05$) y N2 ($P < 0.00005$). La progenie N2 fue significativamente más resistente que las progenies de las cepas YY538 y RB1304 a los 30 minutos ($P < 0.00005$), y a la hora fue significativamente más resistente que las 3 cepas mutantes ($P < 0.00005$). Estos resultados sugieren que las cepas mutantes presentan dificultades para heredar la resistencia, es probable que la mayor sensibilidad en las progenies con exposición de las cepas YY538 y MT13293 (en comparación con su contraparte sin exposición) sea un costo asociado al cebado observado en la P0.

Durante la P0 y la F1 se incluyeron grupos con y sin exposición a levamisol 40 μM , esto se hizo con la finalidad de detectar si había resistencia intrínseca en alguna cepa mutante, pero ninguna de estas fue significativamente más resistente que una cepa silvestre N2 con exposición. A partir de la F2 en adelante solo se incluyó a la progenie derivada de los padres expuestos a levamisol 40 μM para cada cepa. A continuación, se describe lo observado en la F2 (Figura 6).

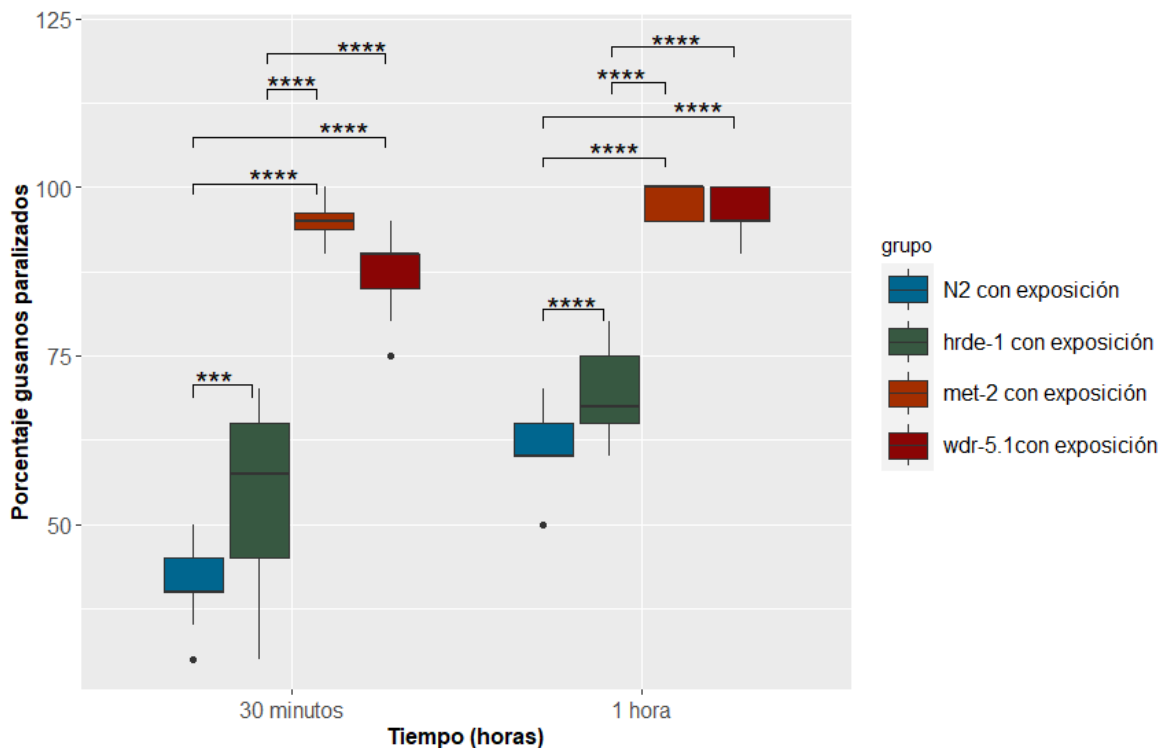


Figura 6. Comparación del porcentaje de parálisis de la segunda progenie (F2) de las cepas mutantes YY538 (*hrde-1*), MT13293 (*met-2*) y RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición con la F2 de la cepa N2 con exposición.

En estos bioensayos solo se incluyó a la progenie derivada de los padres expuestos a levamisol. Cada cepa está representada por un color. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): ***<math><0.0005</math>, ****<math><0.00005</math>.

La cepa N2 fue significativamente más resistente que las tres cepas mutantes a los 30 minutos y a la hora ($P < 0.00005$). La cepa mutante YY538 fue significativamente más resistente que las cepas mutantes MT13293 y RB1304 en los 2 tiempos ($P < 0.00005$). No hubo diferencias significativas entre las mutantes MT13293 y RB1304 en ninguno de los 2 tiempos, las cuales se mantuvieron como las cepas más sensibles al levamisol durante la F2.

A continuación, se describe lo observado durante la F3 (Figura 7).

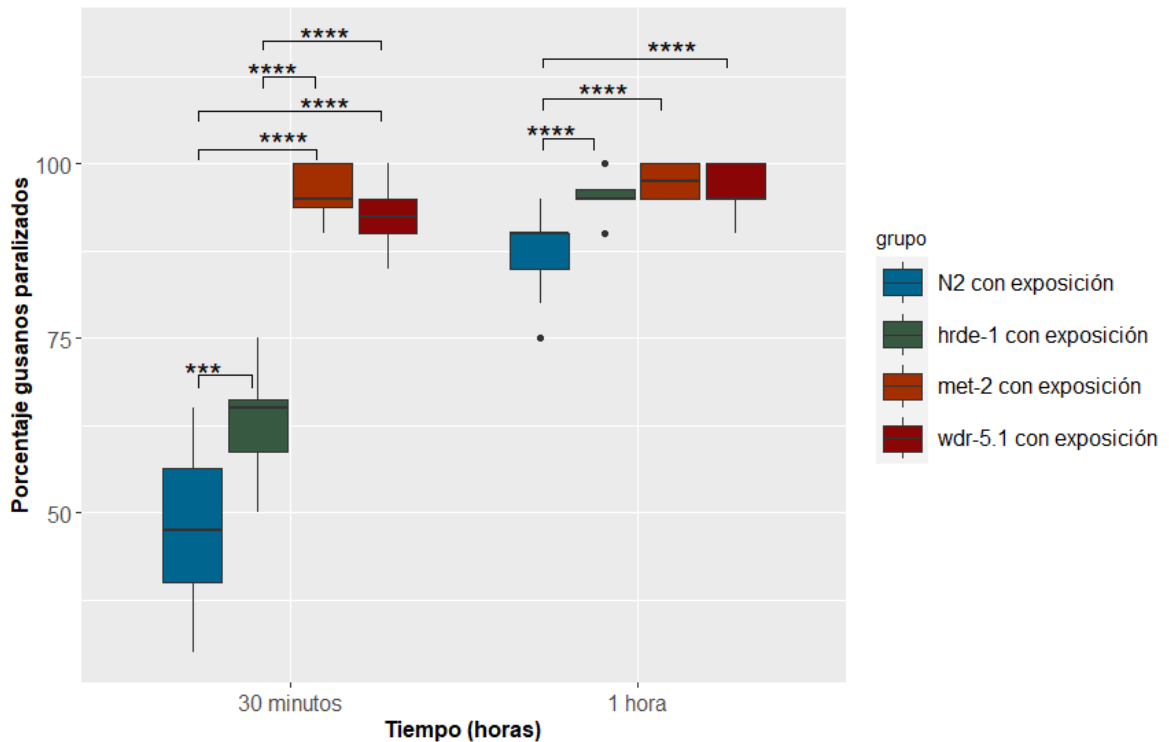


Figura 7. Comparación del porcentaje de parálisis de la tercera progenie (F3) de las cepas mutantes YY538 (*hrde-1*), MT13293 (*met-2*) y RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición con la F3 de la cepa N2 con exposición.

Cada cepa está representada por un color. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): ***<0.0005, ****<0.00005.

La progenie N2, de nueva cuenta, fue significativamente más resistente que las tres cepas mutantes a los 30 minutos y a la hora ($P < 0.00005$). La cepa mutante YY538 fue significativamente más resistente que las cepas MT13293 y RB1304 solo a los 30 minutos ($P < 0.00005$), no habiendo diferencias significativas a la primera hora. No hubo diferencias significativas entre las cepas MT13293 y RB1304 en ninguno de los 2 tiempos, las cuales se mantuvieron como las más sensibles en la F3.

A continuación, se describe lo observado durante la F4 (Figura 8).

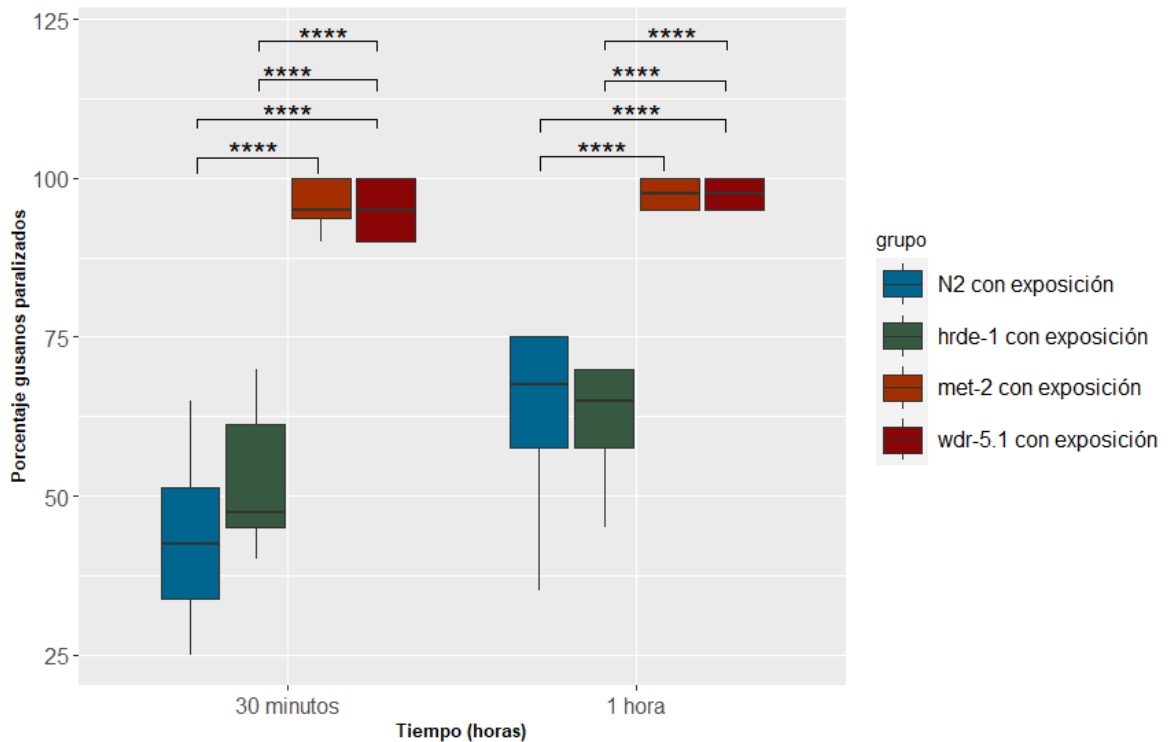


Figura 8. Comparación del porcentaje de parálisis de la cuarta progenie (F4) de las cepas mutantes YY538 (*hrde-1*), MT13293 (*met-2*) y RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición con la F4 de la cepa N2 con exposición.

Cada cepa está representada por un color. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): ****<math>P < 0.00005</math>.

No hubo diferencias significativas entre la cepa N2 y la cepa YY538 en ninguno de los 2 tiempos, ambas cepas fueron significativamente más resistentes que las cepas MT13293 y RB1304 en los 2 tiempos ($P < 0.00005$). No hubo diferencias significativas entre las cepas MT13293 y RB1304, las cuales se mantuvieron como las más sensibles.

A continuación, se describe lo observado durante la F5 (Figura 9).

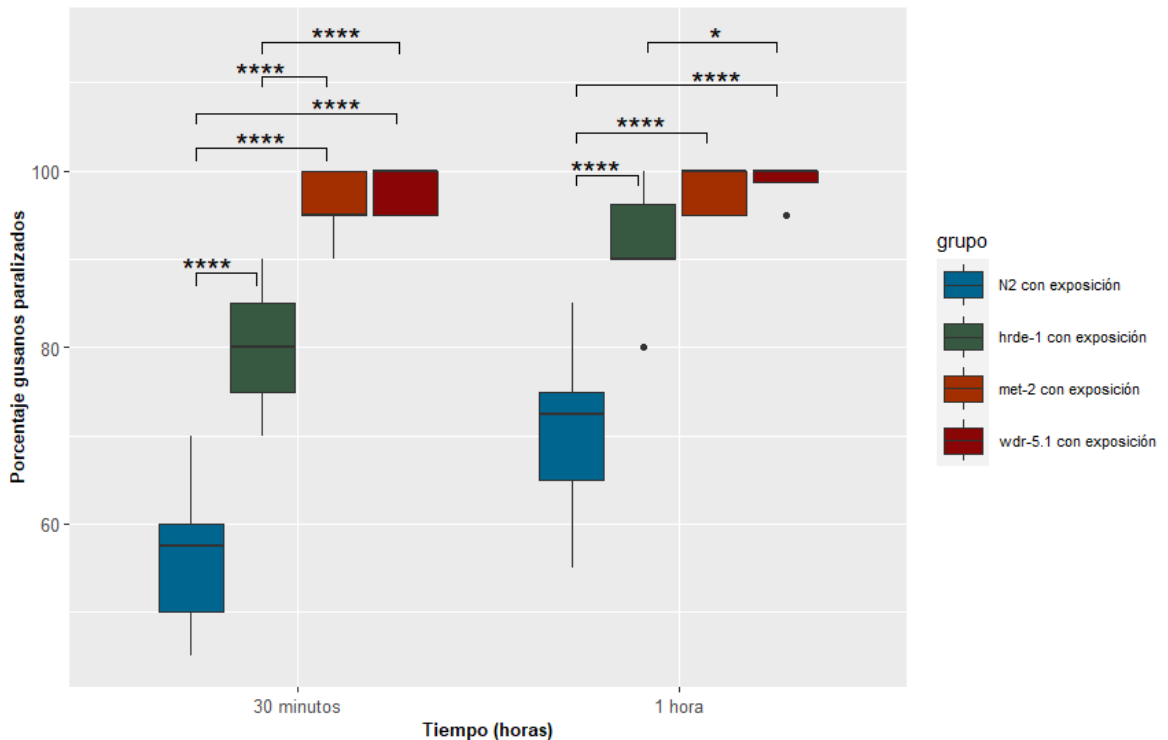


Figura 9. Comparación del porcentaje de parálisis de la quinta progenie (F5) de las cepas mutantes YY538 (*hrde-1*), MT13293 (*met-2*) y RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición con la F5 de la cepa N2 con exposición.

Cada cepa está representada por un color. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): * <0.05 , **** <0.00005 .

La cepa N2 fue significativamente más resistente que las 3 cepas mutantes en los 2 tiempos ($P < 0.0005$). La cepa YY538 fue significativamente más resistente que las cepas RB1304 y MT13293 a los 30 minutos ($P < 0.0005$) y significativamente más resistente que la mutante RB1304 a la hora ($P < 0.05$). No hubo diferencias significativas en el porcentaje de parálisis entre las mutantes MT13293 y RB1304 en ninguno de los 2 tiempos, manteniéndose como las más sensibles al fármaco.

A continuación, se describe lo observado durante la F6 (Figura 10).

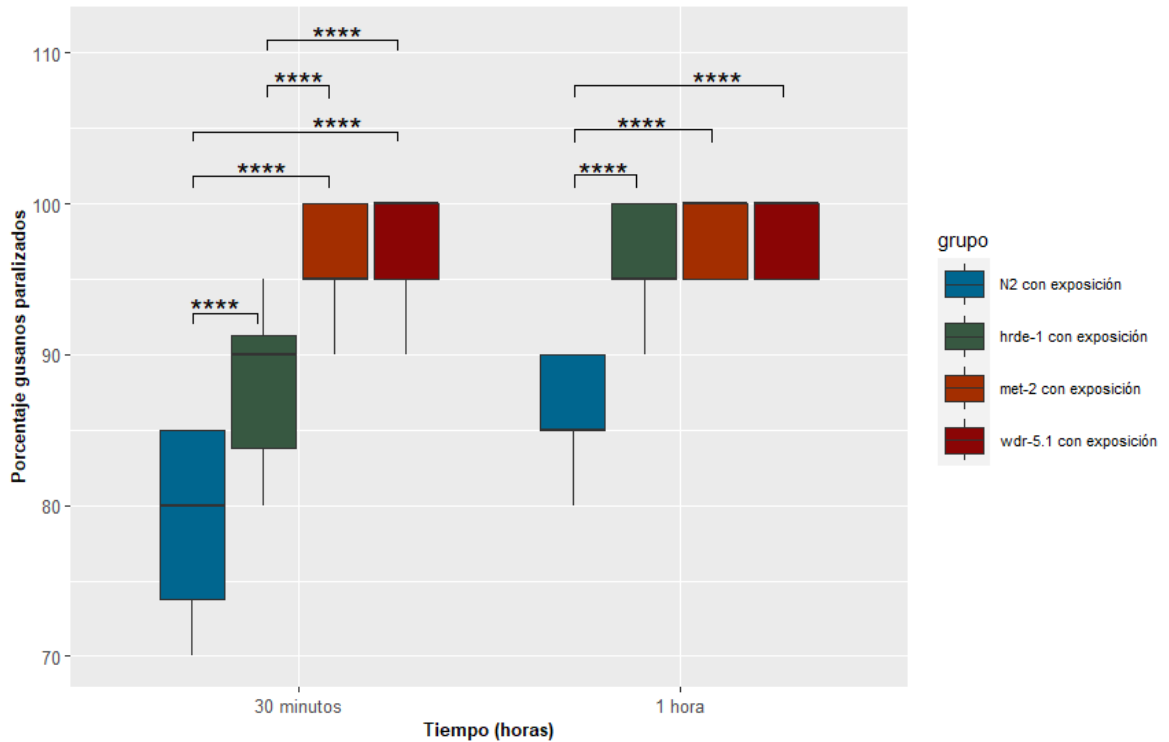


Figura 10. Comparación del porcentaje de parálisis de la sexta progenie (F6) de las cepas mutantes YY538 (*hrde-1*), MT13293 (*met-2*) y RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición con la F6 de la cepa N2 con exposición.

Cada cepa está representada por un color. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): ****<math>< 0.00005</math>.

La cepa N2 fue significativamente más resistente que las tres cepas mutantes en los 2 tiempos ($P < 0.00005$). La cepa YY538 fue significativamente más resistente que las cepas MT13293 y RB1304 a los 30 minutos ($P < 0.00005$) pero no a la hora. No hubo diferencias significativas entre las cepas MT13293 y RB1304 en ninguno de los 2 tiempos. Estas cepas fueron las más sensibles al fármaco en la mayoría de las progenies.

6.5 Herencia de la resistencia en la cepa MT13293 (*met-2*)

Para intentar determinar si existe una herencia intergeneracional y/o transgeneracional de la resistencia al levamisol, se comparó a cada cepa mutante con la cepa de referencia N2 con y sin exposición a levamisol 40 μ M. Se comparó a todas las progenies de la cepa N2 con exposición con las progenies de la cepa MT13293 (*met-2*) con exposición (Figura 11).

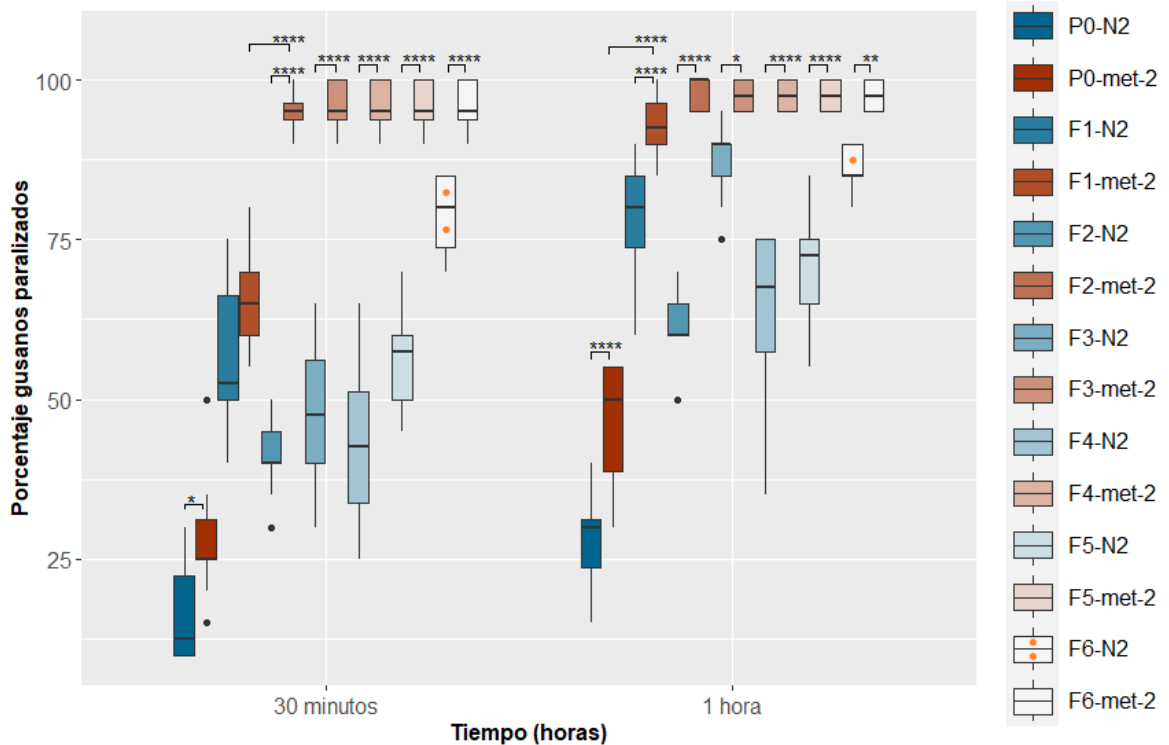


Figura 11. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de las cepas N2 y MT13293 (*met-2*), ambas con exposición a levamisol 40 μ M.

Las progenies de la cepa N2 están representadas con los distintos tonos de azul, excepto la F6 que tiene dos puntos naranjas para distinguirla de la F6 de la cepa MT13293 (*met-2*). Las progenies de la cepa MT13293 (*met-2*) están representadas con los distintos tonos de naranja, excepto la F6 que está representada con blanco. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): * <0.05, ** <0.005 ****<0.00005.

En estas comparaciones, la P0 de la cepa MT13293 fue la más resistente en los 2 tiempos (en comparación con sus progenies), sin embargo, no fue tan resistente como la P0 de la cepa N2 con exposición a los 30 minutos ($P < 0.05$) ni a la hora ($P < 0.00005$). También se observó resistencia en la F1 de la cepa MT13293, comparable con la F1 de la cepa N2 a los 30 minutos, donde no hubo diferencias significativas entre ambas progenies. La resistencia en la cepa MT13293 solo perduró hasta la F1 a los 30 minutos, ya que a partir de la F2 el porcentaje de parálisis aumentó significativamente en comparación con la F1 ($P < 0.00005$) y se mantuvo sin diferencias significativas hasta la F6. A la hora, el porcentaje de parálisis de la cepa MT13293 aumentó significativamente en la F1 en comparación con su P0 ($P < 0.00005$), y no hubo diferencias significativas entre la F1 y sus siguientes progenies, es decir, no hubo resistencia más allá de la población parental. Para poder detectar de mejor manera si existe o no una herencia de la resistencia en la cepa mutante MT13293 (*met-2*), también se comparó a esta cepa con exposición con la cepa N2 sin exposición. (Figura 12).

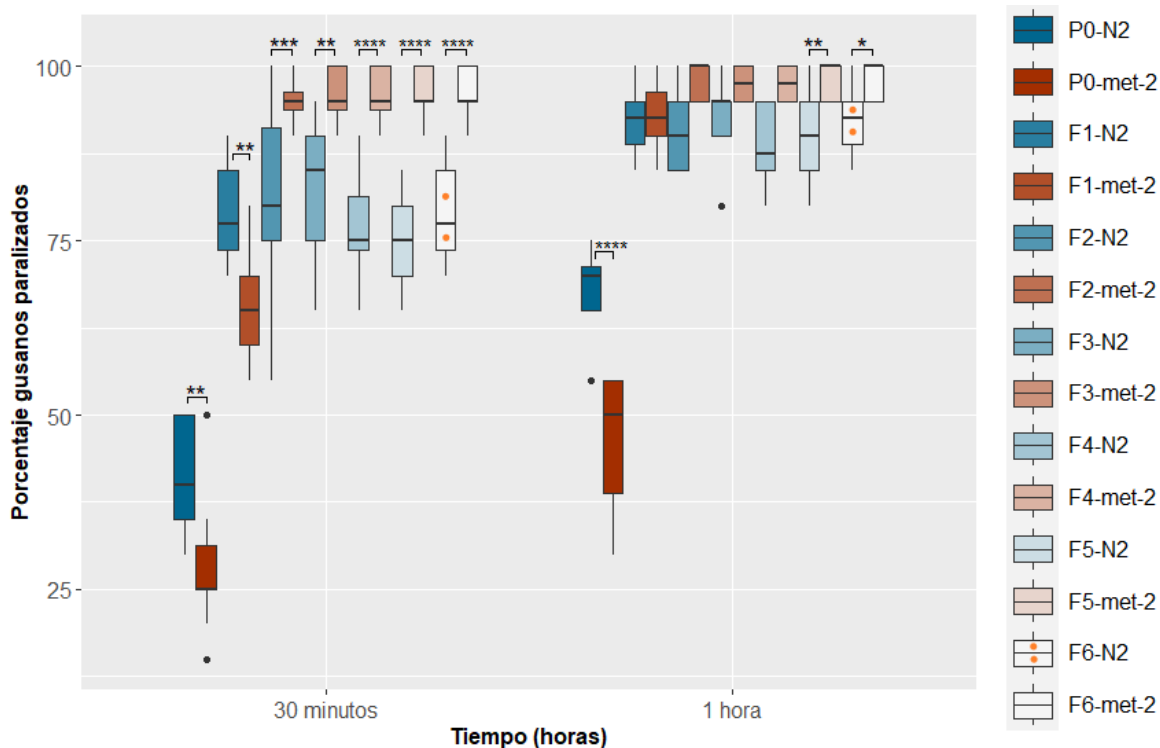


Figura 12. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de la cepa N2 sin exposición a levamisol 40 μ M y la cepa MT13293 (*met-2*) con exposición a levamisol 40 μ M.

Las progenies de la cepa N2 están representadas con los distintos tonos de azul, excepto la F6 que tiene dos puntos naranjas para distinguirla de la F6 de la cepa MT13293 (*met-2*). Las progenies de la cepa MT13293 (*met-2*) están representadas con los distintos tonos de naranja, excepto la F6 que está representada con blanco. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): * <0.05, ** <0.005, ***<0.0005, ****<0.00005.

En estas comparaciones, la P0 de la cepa MT13293 fue más resistente en los 2 tiempos en comparación con la P0 de la cepa N2 ($P < 0.005$). La F1 de la cepa MT13293 fue significativamente más resistente que su contraparte N2 a los 30 minutos ($P < 0.05$), no hubo

diferencias significativas entre las F1 de ambas cepas a la hora. La cepa MT13293 fue significativamente más sensible que la cepa N2 durante la F2-F6 a los 30 minutos. Estos resultados sugieren que este mecanismo epigenético está asociado con la resistencia al levamisol y con la herencia transgeneracional de dicha resistencia.

6.6 No hay herencia de la resistencia en la cepa RB1304 (*wdr-5.1*)

Se compararon los porcentajes de parálisis de todas las progenies de la cepa RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición con la cepa N2 con exposición (Figura 13).

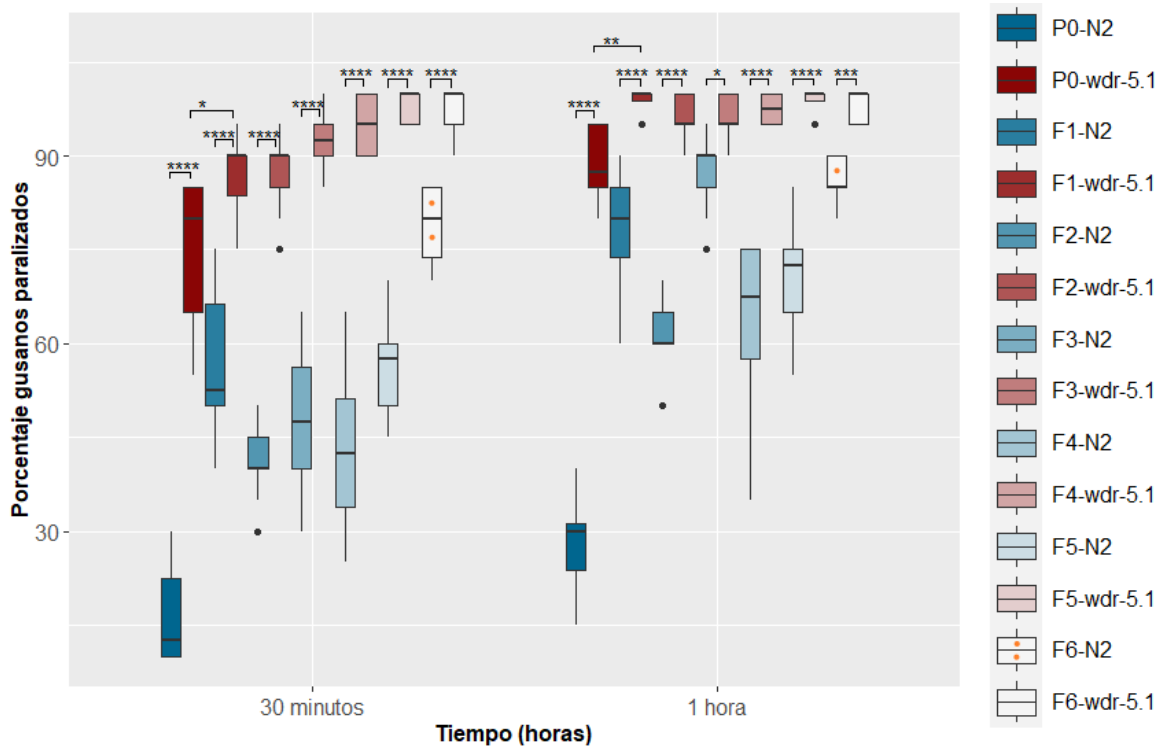


Figura 13. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de las cepas N2 y RB1304 (*wdr-5.1*), ambas con exposición.

Las progenies de la cepa N2 están representadas con los distintos tonos de azul, excepto la F6 que tiene dos puntos naranjas para distinguirla de la F6 de la cepa RB1304 (*wdr-5.1*). Las progenies de la cepa RB1304 (*wdr-5.1*) están representadas con los distintos tonos de rojo, excepto la F6 que está representada con blanco. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): * < 0.05, ** < 0.005, *** < 0.0005, **** < 0.00005.

En estas comparaciones, tanto la P0 como todas las progenies de la cepa N2 fueron significativamente más resistentes que la cepa RB1304 en los 2 tiempos. Se observó una diferencia significativa entre la P0 y la F1 de la cepa RB1304 a los 30 minutos ($P < 0.05$) y a la hora ($P < 0.005$), es decir, los padres fueron más resistentes que su progenie en los 2 tiempos, sin embargo, no existen diferencias significativas en el porcentaje de parálisis entre sus progenies F1-F6 en los 2 tiempos, esto sugiere que la P0 no pudo transmitir su resistencia a la progenie. Para intentar determinar de mejor manera si existe o no una herencia de la resistencia en esta cepa, se comparó a la cepa RB1304 con exposición con la cepa N2 sin exposición (Figura 14).

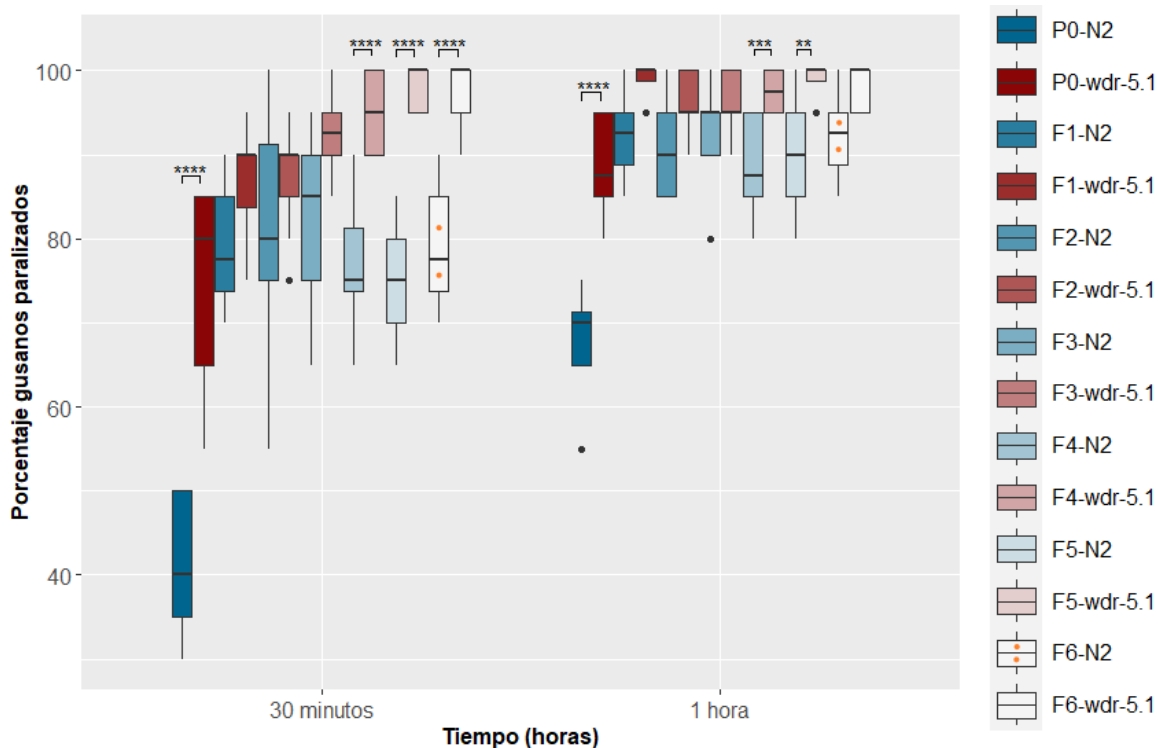


Figura 14. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de la cepa N2 sin exposición a levamisol 40 μ M y la cepa RB1304 (*wdr-5.1*) con exposición a levamisol 40 μ M.

Las progenies de la cepa N2 están representadas con los distintos tonos de azul, excepto la F6 que tiene dos puntos naranjas para distinguirla de la F6 de la cepa RB1304 (*wdr-5.1*). Las progenies de la cepa RB1304 (*wdr-5.1*) están representadas con los distintos tonos de rojo, excepto la F6 que está representada con blanco. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): ** <0.005, ***<0.0005, ****<0.00005.

En estas comparaciones, la cepa RB1304 nunca fue más resistente que la cepa N2. Incluso, la cepa N2 fue significativamente más resistente que la cepa RB1304 durante la P0, F4, F5 y F6 a los 30 minutos ($P < 0.00005$) y significativamente más resistente durante la P0, F4 y F5

a la hora. A pesar de que la P0 de la cepa RB1304 fue significativamente más resistente que sus progenies, esta sigue siendo significativamente más sensible que una cepa N2 sin exposición.

6.7 Herencia de la resistencia en la cepa YY538 (*hrde-1*)

Se comparó el porcentaje de parálisis de las progenies de la cepa N2 con exposición y la cepa YY538 (*hrde-1*) con exposición (Figura 15).

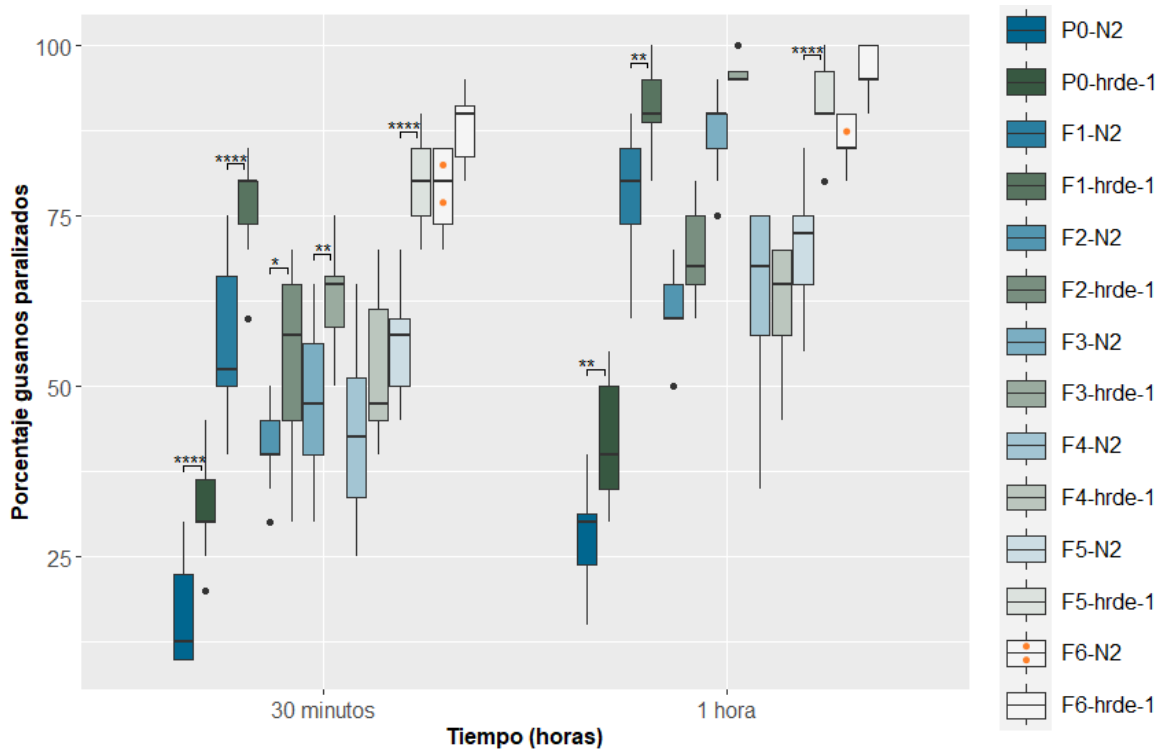


Figura 15. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de las cepas N2 y YY538 (*hrde-1*), ambas con exposición.

Las progenies de la cepa N2 están representadas con los distintos tonos de azul, excepto la F6 que tiene dos puntos naranjas para distinguirla de la F6 de la cepa YY538 (*hrde-1*). Las progenies de la cepa YY538 (*hrde-1*) están representadas con los distintos tonos de verde, excepto la F6 que está representada con blanco. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo): * < 0.05, ** < 0.005 **** < 0.00005.

En estas comparaciones, la cepa YY538 nunca fue significativamente más resistente que la cepa N2. Incluso, la cepa YY538 fue significativamente más sensible durante la P0, F1, F2, F3 y F5 a los 30 minutos y significativamente más sensible que la cepa N2 en la P0, F1 y F5 a la primera hora. La P0 de la cepa YY538 fue más resistente que sus progenies en ambos tiempos. Para intentar determinar de mejor manera si existe una herencia intergeneracional y/o transgeneracional de la resistencia al levamisol en la cepa YY538, se comparó a todas las progenies de la cepa N2 sin exposición con la cepa YY538 con exposición (Figura 16).

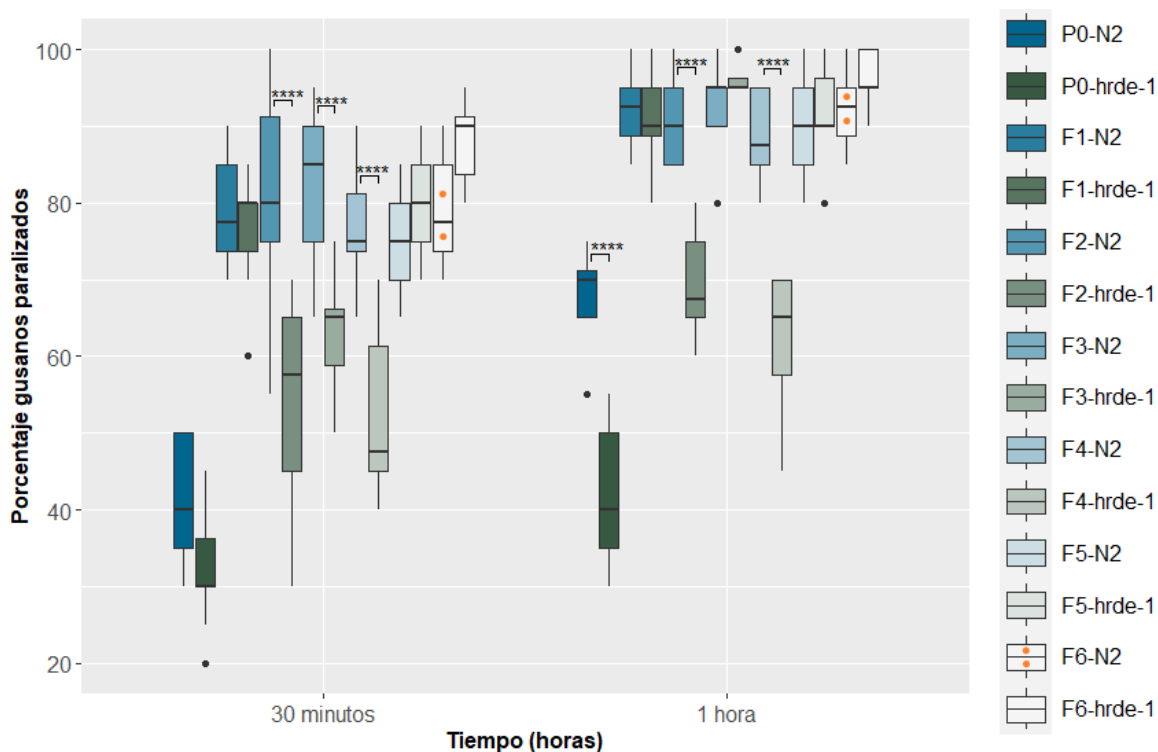


Figura 16. Comparación de los porcentajes de parálisis de todas las progenies de la cepa N2 sin exposición a levamisol 40 μ M y la cepa YY538 (*hrde-1*) con exposición a levamisol 40 μ M.

Las progenies de la cepa N2 están representadas con los distintos tonos de azul, excepto la F6 que tiene dos puntos naranjas para distinguirla de la F6 de la cepa YY538 (*hrde-1*). Las progenies de la cepa YY538 (*hrde-1*) están representadas con los distintos tonos de verde, excepto la F6 que está representada con blanco. El valor de significancia estadística P se calculó con la prueba t-Student por pares, (utilizando el ajuste de Bonferroni) y está representado con asteriscos sobre las barras (solo si el resultado fue significativo):
 ****<math>< 0.00005</math>

En estas comparaciones, la P0 de la cepa YY538 fue significativamente más resistente que la P0 de la N2 a la primera hora ($P < 0.00005$), no habiendo diferencias significativas a los 30 minutos. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de parálisis entre las F1 de

ambas cepas en ambos tiempos. La F2 de la cepa YY538 fue significativamente más resistente que la cepa N2 en ambos tiempos ($P < 0.00005$). La F3 de la cepa YY538 fue significativamente más resistente que la N2 a los 30 minutos ($P < 0.00005$) pero no a la hora. La F4 de la cepa YY538 fue significativamente más resistente que la F4 de la cepa N2 en ambos tiempos ($P < 0.00005$). No hubo diferencias significativas en el porcentaje de parálisis para la F5 y F6 de ambas cepas en ambos tiempos.

VII. Discusión

7.1 Efecto del cebado con levamisol en la cepa N2 de *C. elegans*

Diversos estudios han demostrado que *C. elegans* es capaz de generar una memoria al estrés, la cual le permite responder de manera más efectiva ante el mismo factor de estrés o uno diferente (Frazier & Roth, 2009; Kishimoto et al., 2017; Willis et al., 2020; Zhou et al., 2019). Los resultados obtenidos sugieren que *C. elegans* también es capaz de generar una memoria al levamisol. La cepa de referencia N2 que recibió una exposición con levamisol a 40 μM fue significativamente más resistente a una concentración de 400 μM de levamisol, en comparación con gusanos que no recibieron dicha exposición, es decir, se pudo generar un estado cebado, el cual permitió a los gusanos generar una respuesta más eficiente ante el levamisol, este estado solo perduró por 5 progenies, hasta que en la F6 se regresó a un estado basal o previo a la exposición. Esta memoria al levamisol pudo haber variado dependiendo del tiempo de exposición y la concentración de levamisol utilizada, por ejemplo, Klosin et al. (2017) expusieron a *C. elegans* a una alta temperatura (25 °C) durante 5 progenies seguidas, las siguientes progenies crecieron a una temperatura más baja, utilizaron un transgén (*daf-21::mCHERRY*), midieron su expresión a lo largo de estas 5 progenies (de exposición) y las posteriores y observaron que la expresión del transgén aumentaba significativamente en las progenies (hasta la F13) de gusanos expuestos a 25 °C, en comparación con gusanos que siempre habían crecido en temperaturas más bajas, es decir, la expresión del transgén seguía siendo elevada a pesar de la disminución de la temperatura, hasta que en la F14 sus niveles de expresión regresaron a un estado basal. Los autores también probaron el efecto que tiene la exposición de *C. elegans* a 25 °C, pero solo durante una progenie, en este caso, la expresión del transgén se mantuvo elevada solo por 7 progenies. Este aumento en la expresión del transgén iba acompañado de una disminución de la marca H3K9me3 asociada a heterocromatina, se determinó que *set-25* (HMT específica de H3K9me3) estaba asociada con la disminución de H3K9me3. Con base en estas observaciones se propuso un modelo en el cual, las altas temperaturas disminuyen la actividad de *set-25*, esto genera una disminución importante de H3K9me3 y por consecuencia, el desilenciamiento de distintos genes que persiste durante varias

generaciones, cuando la temperatura disminuye, el estado de *set-25* vuelve a la normalidad y puede volver a restablecer las marcas H3K9me3, pero este proceso le llevaría varias generaciones antes de retornar a un estado basal. Estos resultados sugieren que el periodo de exposición repercute en la duración de una respuesta, en este caso, la expresión elevada del transgén y el estado de cromatina asociado, fueron heredados durante más progenes cuando el periodo de exposición fue más largo, así mismo, este estudio da una posible explicación de la reversión a un estado basal o previo a la exposición; después de la exposición a cierto estímulo, los cambios que se inducen a nivel epigenético se pueden revertir, pero las proteínas modificadoras de histonas requieren de un cierto lapso de tiempo para restablecer el patrón original de cromatina, es decir, ese patrón previo a la exposición de algún estímulo (Klosin et al., 2017). En este estudio se expuso a los gusanos a una concentración de levamisol de 40 μM durante todas sus etapas de desarrollo larval (L1, L2, L3 y L4), y se pudo observar una herencia tanto intergeneracional como transgeneracional de la resistencia. Sería interesante observar el efecto que tiene la exposición a concentraciones más altas de 40 μM y durante lapsos de tiempo más prolongados, sobre la resistencia al levamisol en los gusanos adultos y en su progenie.

7.2 Efecto del cebado con levamisol en todas las cepas de *C. elegans* durante la P0

Al comparar a todas las cepas con exposición y sin exposición durante la P0, se observó que todas las cepas que recibieron dicha exposición fueron significativamente más resistentes que su contraparte sin exposición, en alguno de los 2 tiempos o en ambos, esto sugiere que los mecanismos epigenéticos de metilación de histonas MET-2, WDR-5 y la proteína argonauta HRDE-1 no son indispensables, por sí solos, para la generación de una memoria al levamisol en la P0, ya que todas las cepas que recibieron la exposición fueron capaces de montar una respuesta más efectiva ante una concentración de 400 μM de levamisol, sin embargo, el hecho de poseer los 3 mecanismos epigenéticos podría favorecer la memoria y la respuesta, ya que la cepa N2 fue significativamente más resistente que las cepas mutantes, esto podría sugerir que los 3 mecanismos epigenéticos permiten preparar una memoria más robusta y, por lo tanto, una respuesta más efectiva contra el levamisol. No es posible asegurar que el fenotipo

de resistencia no se deba a una mutación puntual adquirida en alguna progenie, sin embargo, si una mutación que se fija en el genoma es responsable de tal fenotipo resistente, no cabría esperar una regresión a un estado basal o previo a la exposición, lo cual es una característica del cebado (Hilker et al., 2015; Liu et al., 2022; Martinez-Medina et al., 2016; Liberman et al., 2019) y fue lo que ocurrió en este estudio, por lo que sería poco probable que sea una mutación la que explique este fenotipo de resistencia. *C. elegans* ha sido utilizado para estudiar los efectos generacionales de varios estresores ambientales, en estos estudios se ha observado que los cambios en el fenotipo, inducidos por la exposición a algún factor estresante, suelen regresar a un estado basal después de un cierto número de generaciones, así mismo, se ha observado que los cambios en el fenotipo se acompañan de cambios en algún componente epigenético. Por ejemplo, Yu y Liao (2016) expusieron a la cepa silvestre N2 de *C. elegans* a arsenito (As) 1mM solo durante la P0. Se examinó a las progenes F1-F5 y se observó que la exposición previa a As disminuyó el tamaño de las crías, sin embargo, el tamaño aumentaba conforme se pasaba de una generación a la siguiente, es decir, se observó una recuperación gradual del tamaño, así mismo, se observó una disminución significativa en la expresión de *spr-5* (desmetilasa específica de H3K4me2) durante la P0-F3, la expresión de *spr-5* volvió a niveles basales en la F4. También se observó un incremento significativo de la marca H3K4me2 (asociada a eucromatina) durante la P0-F3, pero esta regresó a niveles basales en la F4. Estos resultados sugirieron que los defectos reproductivos transgeneracionales están asociados con los cambios de expresión de *spr-5* y con el aumento de H3K4me2 generados por la exposición previa a As (Yu & Liao, 2016). Li et al. (2018) expusieron a *C. elegans* a 20 mg/L de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) solo durante la P0. Se examinó a las progenes y se observaron defectos en la locomoción y una disminución del tamaño de las crías durante la F1-F4, sin embargo, ambos fenotipos mostraron una pequeña recuperación del fenotipo normal en la F5. Se observó que la expresión génica *spr-5* (desmetilasa específica de H3K4me2) estaba disminuida durante la P0-F1, sin embargo, mostró una recuperación su patrón normal de expresión después de la F1. Sus resultados sugirieron que la exposición previa al DEHP provoca defectos transgeneracionales en la locomoción y en la reproducción, los cuales están asociados con la disminución en la expresión de *spr-5* y la deficiencia de las marcas H3K4me2 (Li et al., 2018). Moore et al.

(2019) entrenaron a la cepa silvestre N2 de *C. elegans* para que evitara a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* (PA14). Para esto, la P0 creció en placas sembradas con PA14, se observó que la progenie derivada de gusanos expuestos a PA14 evitaba a dicha bacteria, este comportamiento de evitación perduró hasta la F4, mientras que en la F5, los gusanos eran atraídos nuevamente a PA14. Se observaron cambios en la expresión génica de gusanos entrenados con PA14, incluidos cambios en la expresión de siARN, también se determinó que había una asociación entre *set-25* (codifica para una HMT específica H3K9) y *hpl-2* (modificador de cromatina) con la conducta de evitación (Moore et al., 2019). Estos estudios muestran que los cambios en el fenotipo inducidos por algún factor estresante, solo perduran un cierto número de progenies antes de regresar a un estado basal; así mismo, los cambios en el fenotipo se acompañan de cambios en algún componente epigenético. Esta evidencia sugiere que, es muy probable que sean los mecanismos epigenéticos los que medien la herencia de ciertos rasgos (transitorios), después de la exposición a algún agente estresante.

Durante la P0, hubo cepas en las que el cebado con levamisol a 40 μ M fue más efectivo, lo cual se refleja en la disminución de su porcentaje de parálisis (en comparación con su contraparte sin exposición). La cepa MT13293 fue la que logró reducir más su porcentaje de parálisis en ambos tiempos, esto puede sugerir que el mecanismo de metilación de histonas H3K9me (asociado a heterocromatina) mediado por MET-2, no es tan importante como los otros 2 para la formación de la memoria y la respuesta al estrés durante la P0, ya que a pesar de no poseer este mecanismo logró la mayor reducción del porcentaje de parálisis, aunque no haya sido la más resistente (la cepa más resistente fue la N2 con exposición). En cambio, la cepa RB1304 fue en la que menos se redujo el porcentaje de parálisis, esto puede sugerir una mayor importancia de este mecanismo en la generación de la memoria y la respuesta al levamisol en la P0. La cepa YY538 también logró una reducción significativa en el porcentaje de parálisis en la P0, lo que sugiere que el argonauta HRDE-1 tiene una menor relevancia en la formación de la memoria y la respuesta al levamisol en comparación con la HMT WDR.5.

7.3 Importancia de los mecanismos epigenéticos *met-2*, *wdr-5.1* y *hrde-1* en la herencia intergeneracional y transgeneracional de la resistencia al levamisol

En la F1, el cebado fue más efectivo en la cepa N2, ya que fue en la que más se redujo el porcentaje de parálisis en los 2 tiempos, también fue significativamente más resistente que las 3 cepas mutantes a la hora. Las tres cepas mutantes no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de parálisis a los 30 minutos (respecto a su contraparte sin exposición), sin embargo, las cepas YY538 y MT13293 con exposición fueron significativamente más sensibles al levamisol que su contraparte sin exposición a la primera hora, mientras que la cepa RB1304 no mostró diferencias significativas con su contraparte sin exposición a la hora. Estos resultados sugieren que las cepas mutantes presentan dificultades para heredar la resistencia que se presentó en los padres a la F1, esto podría sugerir la importancia de los 3 mecanismos epigenéticos en la herencia de la resistencia. Resultaría de gran utilidad hacer un análisis de la expresión génica y observar las diferencias entre ambos tipos de progenies (expuesta y no expuesta) y entre cepas, este análisis podría ayudar a determinar, si en las cepas mutantes, el cebado generado por la exposición a levamisol 40 μ M en la generación P0, condiciona una mayor sensibilidad al fármaco en las siguientes generaciones. No se logró observar algún tipo de resistencia intrínseca al levamisol por parte de las cepas mutantes; estas nunca fueron significativamente más resistentes que una cepa N2 con exposición. Por ejemplo, Espínola (2023) expuso a las cepas silvestre N2 de *C. elegans* a una concentración de 200 mM de NaCl por 24 horas (acondicionamiento), esta exposición fue solo para la población parental (P0), posteriormente midió la resistencia de las progenies derivadas de esta P0 en una concentración de 400 mM de NaCl a las 24 horas. Sus resultados mostraron que las progenies F1-F6, derivadas de padres expuestos a 200 mM de NaCl, eran significativamente más resistentes al NaCl 400 mM que las progenies derivadas de padres que crecieron en condiciones normales (controles). En este estudio también se analizaron a las cepas mutantes YY538 (*hrde-1*), RB1304 (*wdr-5.1*) y MT13293 (*met-2*), las P0 de las 3 cepas mutantes recibieron el mismo acondicionamiento con 200 mM de NaCl y se midió el comportamiento de sus progenies desde la F1 hasta la F4 en diferentes lapsos de tiempo (2, 4 y 24 horas), las comparaciones entre las cepas mutantes y la cepa N2 (con y sin

acondicionamiento) mostraron que la cepa mutante YY538 (*hrde-1*) era significativamente más resistente que una cepa N2 con acondicionamiento en algunas progenies y lapsos de tiempo, por lo que se optó por analizar el comportamiento de todas las cepas, pero sin una exposición previa a NaCl 200mM, en estos ensayos la cepa YY538 (*hrde-1*) fue significativamente más resistente que el resto de cepas a las 2 y 4 horas, también fue significativamente más resistente que la cepa N2 y la cepa mutante RB1304 (*wdr-5.1*) a las 24 horas (Espínola, 2023). Estos resultados muestran que dicha cepa presenta un fenotipo intrínseco de resistencia al estrés osmótico, la privación de ese gen, de alguna manera, confiere una mayor resistencia a dicho estrés, lo cual resulta muy interesante y amerita más estudios al respecto.

A partir de la F2 solo se incluyó a la progenie derivada de los padres expuestos al levamisol para cada cepa. Durante la F2-F6, la cepa N2 fue significativamente más resistente al fármaco que las 3 cepas mutantes (a excepción de la F4, en la que no hubo diferencias significativas con la cepa YY538 en ninguno de los 2 tiempos) en ambos tiempos, y las cepas MT13293 y RB1304 se mantuvieron como las más sensibles al fármaco en alguno de los 2 tiempos o en ambos. Estos resultados sugieren que los 2 mecanismos epigenéticos de metilación de histonas MET-2 y WDR-5 tienen una mayor relevancia en la resistencia al levamisol, ya que estas cepas fueron las más susceptibles al fármaco en la mayoría de las progenies, sería interesante comparar los locus enriquecidos con H3K4me1/2/3 y H3K9me1/2/3 en la cepa N2 y contrastarlos con las cepas mutantes, con el fin de identificar cuáles son los posibles locus asociados a una mayor resistencia. En *C. elegans*, la modificación de la cromatina es un proceso que se puede inducir por la exposición a varios agentes estresantes, y las marcas de histonas y sus proteínas asociadas parecen ser responsables, en parte, de la herencia de los fenotipos causados por la exposición a tales agentes (se pueden ver más ejemplos de esto en las secciones previas 7.1 y 7.2). Por ejemplo, Camacho et al. (2018) expusieron a *C. elegans* bisfenol A (BPA) solo durante la P0, esta exposición generó un aumento en la apoptosis de la línea germinal, este fenotipo

estaba asociado con la disminución de las marcas represivas H3K9me3 y H3K27me3. El silenciamiento de *jmjd-2* (desmetilasa específica de H3K9me3/H3K36me3) y *jmjd-3* (desmetilasa específica de H3K27me3) generó un aumento de H3K9me3 y H3K27me3, también ocasionó que el fenotipo de apoptosis de la línea germinal desapareciera, por lo que se concluyó que las desmetilasas JMJD2 y JMJD3 están asociadas con la herencia transgeneracional de este fenotipo ocasionado por la exposición a BPA. En este estudio también se observó una expresión aberrante de genes asociados con la modificación de la cromatina: *sir-2.4* (gen histona desacetilasa), *ZK1127.3* (gen asociado a la acetilación de histonas), *met-2* (asociado a la metilación de H3K9), *set-26* (asociada a la metilación de H3K9) y *jmjd-1.2* (Camacho et al., 2018). Rudgalvyte et al. (2016) expusieron a *C. elegans* a metilmercurio (MeHg) 10 µM solo durante la P0. Esta exposición causó un retraso en el desarrollo, el cual estaba asociado con un cambio en el patrón de metilación. Se observó que un total de 1975 genes tenían cambios en sus niveles de H3K4me3, en 1467 de estos genes dicha marca estaba aumentada, mientras que en los 508 genes restantes estaba disminuida. Se analizaron los niveles de H3K4me3 en seis genes durante la P0, todos estaban enriquecidos con esta marca y conservaron este patrón de metilación en la F1, es decir, se observó una herencia intergeneracional de las marcas (Rudgalvyte et al., 2016). En este estudio, 2 genes asociados a la metilación de histonas (*met-2* y *wdr-5.1*) fueron los que mostraron un mayor impacto en la resistencia al levamisol, también estuvieron asociados con la herencia intergeneracional (*met-2*) y transgeneracional (*wdr-5.1*) de la resistencia. Toda esta evidencia podría sugerir que las modificaciones de histonas pueden ser parte de un mecanismo general de respuesta a factores estresantes, tal vez es una manera muy práctica y rápida de regular la expresión de una amplia variedad de genes asociados con la respuesta a algún estímulo, cuando dicho estímulo se presenta en dosis pequeñas, las modificaciones de histonas podrían aumentar la expresión genes asociados con un mejor desempeño, tanto en la población parental como en la progenie, lo cual es compatible con los principios de “hormesis” y “cebado” (Calabrese et al., 2007; Hilker et al., 2015). Sin embargo, cuando la concentración del agente estresante es muy alta, las modificaciones de histonas también podrían contribuir en los efectos tóxicos y en la herencia de los mismos.

Para intentar determinar si había una herencia intergeneracional y/o transgeneracional de la resistencia al levamisol en las mutantes *hrde-1*, *met-2* y *wdr-5.1*, se comparó a cada una con la cepa N2 con exposición y sin exposición. Al comparar todas las progenies de la mutante *met-2* se pudo observar que la P0 fue más resistente que sus progenies, y al comparar la mutante *met-2* con la cepa N2 con exposición (Figura 11), a los 30 minutos, se pudo observar que la F1 no mostró diferencias significativas con su contraparte N2, pero a partir de la F2 el porcentaje de parálisis incrementó significativamente y se mantuvo sin cambios significativos para el resto de progenies. Al comparar la mutante *met-2* con la cepa N2 sin exposición (Figura 12), se observó, a los 30 minutos, que la mutante *met-2* solo fue significativamente más resistente en la P0 y la F1, a partir de la F2 en adelante, la mutante *met-2* fue significativamente más sensible al fármaco que la cepa N2. Estos resultados sugieren que este mecanismo epigenético está asociado tanto a la resistencia al levamisol como con la herencia transgeneracional de dicha resistencia, ya que esta cepa no pudo heredar la resistencia más allá de la F1, es decir, en ausencia de MET-2 fue posible heredar la resistencia solo a la F1 (herencia intergeneracional), pero no fue posible una herencia transgeneracional tal como se vio en la cepa N2 con exposición (Figura 3). No sería posible asegurar que esto se deba específicamente a la carencia de las marcas químicas H3K9me1/2, sobre todo por la compleja interacción que hay entre las modificaciones de histonas y la maquinaria de ARNi. Por ejemplo, Lev et al. (2017) demostraron que la esterilidad de la mutante *met-2* de *C. elegans* era un rasgo heredado que no dependía del desequilibrio de las marcas de histonas causado por la ausencia de MET-2, sino más bien del argonauta HRDE-1 y los siARN que transporta, sus resultados sugirieron que MET-2 tiene un papel en la producción de siARN. También se ha documentado que siARN son capaces de mediar la deposición de grupos químicos en las histonas (Lev et al., 2017), con base en esta evidencia sería prudente realizar un diseño experimental que abarque la interacción entre HRDE-1 y la metilación de H3K9 con respecto a la resistencia al levamisol y otros antihelmínticos.

Al comparar a todas las progenies de la mutante *wdr-5.1* se observó que la P0 fue significativamente más resistente que sus progenies, sin embargo, no se encontraron

diferencias significativas en el porcentaje de parálisis entre las progenies F1-F6, es decir, no se observó resistencia más allá de la P0. También se observó que la P0 de la mutante *wdr-5.1* con exposición fue significativamente más resistente que su contraparte *wdr-5.1* sin exposición solo a la primera hora, pero no hubo diferencias entre las F1 de ambos grupos (Figura 4 y Figura 5). Al comparar la mutante *wdr-5.1* con la cepa N2 con exposición se pudo observar que la cepa N2 fue significativamente más resistente en todas las progenies (P0-F6), y al comparar la mutante *wdr-5.1* con la cepa N2 sin exposición se observó que la mutante *wdr-5.1* nunca fue significativamente más resistente que la cepa N2, inclusive fue más sensible en algunas progenies (Figura 13 y 14). Estos resultados sugieren que hubo resistencia en la P0 de la mutante *wdr-5.1*; sin embargo, la población parental no fue capaz de heredar dicha resistencia a la progenie. Esto pone al mecanismo de metilación de histonas mediado por WDR-5.1 como el más importante de este estudio, ya que sin él no se pudo observar ningún tipo de herencia, además, esta cepa fue la más sensible al fármaco a lo largo del estudio. Estudios previos han sugerido que existe una interacción entre la metilación de H3K9 y H3K4, por ejemplo, Kerr et al. (2014) reportaron que en la mutante *wdr-5*, los niveles reducidos de H3K4me2 se acompañan de un aumento de H3K9me2. También reportaron que en la mutante *met-2* hay un enriquecimiento de H3K4me2 en genes de espermatogénesis (Kerr et al., 2014). Lee et al. (2019) encontraron que la longevidad presente en la mutante *wdr-5.1* era consecuencia de un aumento de H3K9me2 depositada por MET-2, sugiriendo que la carencia H3K4me2/3 por ausencia continua de *wdr.5.1* está asociada con dicho aumento (Lee et al., 2019). Estos estudios sugieren que existe una retroalimentación entre la metilación de H3K9 y H3K4, y que el desbalance de las marcas de histonas ocasionado por la ausencia de mecanismos de metilación está asociado con la herencia de distintos rasgos como la esterilidad y la longevidad, por lo que sería prudente elaborar un diseño experimental que permita estudiar ambos mecanismos epigenéticos de metilación de histonas, en relación con la resistencia al levamisol y otros antihelmínticos.

Al comparar la cepa N2 con exposición con la mutante *hrde-1*, se observó que la mutante *hrde-1* nunca fue más resistente que la N2, incluso, fue más sensible al fármaco durante varias progenies en ambos tiempos. A pesar de esto, el comportamiento de la mutante *hrde-1* es

más parecido a la cepa *N2* con exposición, en comparación con las otras 2 cepas mutantes, donde hay un incremento gradual en la sensibilidad al fármaco, es decir, la privación de este mecanismo es el que menos impacto tuvo en *C. elegans* con respecto a la resistencia al levamisol. También se comparó a la cepa *hrde-1* con la cepa *N2* sin exposición, la cepa *hrde-1* fue más resistente durante la F2, F3 y F4 a los 30 minutos y significativamente más resistente durante la P0, F2, y F4 a la hora, es decir, esta cepa logró heredar la resistencia inter y transgeneracionalmente. Estos resultados sugieren que la proteína argonauta HRDE-1 está asociada con la resistencia al levamisol más no con la herencia de la misma, ya que esta cepa mutante logró ambos tipos de herencia a pesar de no poseer este mecanismo epigenético. A pesar de que en este estudio *hrde-1* no mostró una asociación con ningún tipo de herencia, no se debe subestimar el papel de los siARN y sus proteínas argonautas asociadas en la herencia de la resistencia al levamisol, ya que existe evidencia de que los siARN están asociados con la herencia de ciertos fenotipos, por ejemplo, ya se mencionó anteriormente que Moore et al. (2019) lograron entrenar a *C. elegans* para que lograra evitar a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa* (PA14), este fenotipo se pudo heredar a la progenie, así mismo, se determinó que la herencia de este comportamiento estaba asociada con cambios en la expresión de siARN, se identificó que un subgrupo de estos siARN interactúan con PIWI (un tipo de proteína argonauta), 466 de estos siARN estaban regulados negativamente, mientras que 254 tenían una expresión aumentada. Se determinó que la vía de señalización regulada por la proteína PRG-1 (proteína argonauta perteneciente al clado piwi) era indispensable para la herencia de la conducta de evitación, ya que el silenciamiento de los componentes de esta vía: *mut-7* (gen asociado a la biogénesis de siARN), *rrf-1* (gen que codifica para una RdRPs), *set-25* (codifica para una HMT específica H3K9) y *hpl-2* (modificador de cromatina) ocasionaba que la progenie F1 de animales entrenados no fueran capaces de evitar a PA14. Esta vía está asociada a la producción de siARN 22G, los cuales son capaces de interactuar con SET-25 y HPL-2 para regular la deposición de H3K9me, una marca asociada a heterocromatina (Moore et al., 2019). Taki et al. (2013) estudiaron el efecto que tiene la exposición ancestral de la cepa *N2* de *C. elegans* a una concentración de nicotina de 20 μ M y 20 mM, tal exposición genera problemas en el movimiento normal de los gusanos, es decir, un fenotipo descoordinado, el cual es heredado a la F1 y F2 (Taki et al., 2013). Taki

et al. (2014) le dieron continuidad a su estudio previo y estudiaron el efecto que tiene la exposición ancestral de *C. elegans* a 20 μ m y 20 mM de nicotina sobre los niveles de expresión de 231 miRNA en la P0 y en su progenie F1 y F2. En la F1, la exposición a nicotina generó un cambio en la expresión del 13.4% de los miARN examinados. En la F2 se detectó un cambio en la expresión de un 6.9% de los miARN examinados. Se predijo que varias vías y procesos se verían afectados por los cambios de expresión de estos miARN, incluida la locomoción, es decir, el cambio en la expresión de miARN estaba relacionado con el fenotipo de descoordinación y con su herencia (Taki et al., 2014). Con base en esta evidencia, sería prudente poner a prueba otros mecanismos asociados con los siARN, como *mut-7*, *rrf-1* o inclusive otras proteínas argonautas como PRG-1.

VIII. Conclusiones

1. *C. elegans* fue capaz de generar una memoria por la exposición a levamisol 40 μM , esta memoria le permitió generar una respuesta más eficiente a una concentración más alta del fármaco, es decir, cebado en Cis.
2. La resistencia al levamisol se pudo heredar intergeneracionalmente y transgeneracionalmente en las cepas N2 y YY538 (*hrde-1*) de *C. elegans*.
3. El mecanismo de metilación de histonas H3K9 mediado por la HMT MET-2 está asociado con la resistencia al levamisol y la herencia transgeneracional de la misma en *C. elegans*.
4. El mecanismo de metilación de histonas H3K4 mediado por la HMT WDR-5.1 está asociado tanto con la resistencia a levamisol como con la herencia intergeneracional y transgeneracional de la misma en *C. elegans*.
5. La cepa mutante YY538 (*hrde-1*) con exposición nunca fue más resistente que la cepa silvestre N2 con exposición, incluso, fue más sensible al fármaco durante varias progenies en ambos tiempos, lo cual sugiere que este mecanismo está asociado a la resistencia al levamisol, sin embargo, esta cepa mutante fue más resistente que el control (N2 sin exposición) durante la F2, F3 y F4 a la hora, es decir, logró una herencia inter y transgeneracional de la resistencia al levamisol a pesar de no poseer *hrde-1*, por lo que se concluyó que *hrde-1* no está asociado con ambos tipos de herencia.

IX. Perspectivas

Se realizó una búsqueda en PubMed utilizando las palabras: “epigenetics”, “resistance” y “anthelmintics”, sin embargo, no se encontraron artículos que relacionaran estos elementos, por lo que es muy probable que este sea uno de los primeros trabajos que estudien la relación entre mecanismos epigenéticos y la resistencia a antihelmínticos. Los resultados de este trabajo sugieren que tal asociación es real, con esta evidencia como respaldo se podría justificar el uso de diferentes técnicas moleculares para intentar dilucidar la relación entre la epigenética y la resistencia a los antihelmínticos. Hay varios genes con posibilidades de ser buenos candidatos en *C. elegans*: *jhd-1* codifica a una desmetilasa H3K9 y ha podido ser asociada a la herencia de longevidad, *set-25* codifica una metiltransferasa H3K9, *spr-5* codifica una desmetilasa H3K4me2 y se sugiere que actúa en conjunto con MET-2 para reforzar un estado de cromatina inactiva en la línea germinal.

La exposición de los padres a levamisol 40 μ M ocasionó que estos, aparentemente, tuvieran un menor tamaño (en todas las cepas) en comparación con gusanos sin exposición. Estos gusanos expuestos también se movían menos que los gusanos no expuestos. Todas las cepas siempre pusieron una suficiente cantidad de huevos para realizar los bioensayos. Aunque no se comparó formalmente el número de huevos y el tamaño de las crías entre gusanos expuestos y no expuestos, sería interesante estudiar si el cebado con levamisol a 40 μ M afecta estas características también.

X. Anexo

Cuadro 1. Resultado del ANOVA de medidas repetidas de los bioensayos utilizando una concentración de 200, 300 y 400 μM en la cepa N2: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 2).

Bioensayos	Efecto	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05	DFn
200, 300 y 400 μM	Tratamiento	5.0e-3	*	2
	Tiempo	2.38e-4	*	1
	Tratamiento: tiempo	9.4e-2	-	2

Cuadro 2. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para la comparación del porcentaje de parálisis entre la cepa N2 con exposición y sin exposición a lo largo de 6 progenies: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 3).

Cepa N2 con y sin exposición	Efecto	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05	DFn
P0-F6	Tratamiento	2.75e-65	*	13
	Tiempo	4.15e-56	*	1
	Tratamiento: tiempo	3.44e-16	*	13

Cuadro 3. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las cepas a lo largo de 6 progenies: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 4-10).

Generación	Efecto	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05	DFn
P0	Tratamiento	2.72e-49	*	7
	Tiempo	2.15e-31	*	1
	Tratamiento: tiempo	3.12e-04	*	7
F1	Tratamiento	1.50e-22	*	7
	tiempo	2.92e-32	*	1
	Tratamiento: tiempo	6.33e-13	*	7
F2	Tratamiento	1.26e-26	*	3
	tiempo	5.78e-14	*	1
	Tratamiento: tiempo	9.35e-06	*	3
F3	Tratamiento	7.03e-19	*	3
	tiempo	2.34e-23	*	1
	Tratamiento: tiempo	5.65e-19	*	3
F4	Tratamiento	1.88e-21	*	3
	tiempo	7.05e-09	*	1
	Tratamiento: tiempo	1.01e-05	*	3
F5	Tratamiento	1.58e-22	*	3
	tiempo	2.45e-12	*	1
	Tratamiento: tiempo	1.04e-08	*	3
F6	Tratamiento	9.61e-15	*	3
	tiempo	3.14e-08	*	1
	Tratamiento: tiempo	2.19e-04	*	3

Cuadro 4. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa MT13293 con exposición y la cepa N2 con exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 11).

Cepas	Efecto	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05	DFn
N2 vs MT13293, ambas con exposición	Tratamiento	6.25e-90	*	13
	tiempo	7.67e-50	*	1
	Tratamiento: tiempo	4.65e-31	*	13

Cuadro 5. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa MT13293 con exposición y la cepa N2 sin exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 12).

Cepas	Efecto	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05	DFn
N2 (sin exposición) vs MT13293	Tratamiento	1.52e-77	*	13
	tiempo	1.54e-44	*	1
	Tratamiento: tiempo	1.14e-23	*	13

Cuadro 6. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa RB1304 con exposición y la cepa N2 con exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 13).

Cepas	Efecto	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05	DFn
N2 vs RB1304, ambas con exposición	Tratamiento	1.02e-84	*	13
	tiempo	6.84e-48	*	1
	Tratamiento: tiempo	3.32e-29	*	13

Cuadro 7. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa RB1304 con exposición y la cepa N2 sin exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 14).

Cepas	Efecto	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05	DFn
N2 (sin exposición) vs RB1304	Tratamiento	1.62e-50	*	13
	tiempo	1.47e-42	*	1
	Tratamiento: tiempo	4.08e-18	*	13

Cuadro 8. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa YY538 con exposición y la cepa N2 con exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 15).

Cepas	Efecto	<i>P</i>	<i>P</i> < 0.05	DFn
N2 vs YY538, ambas con exposición	Tratamiento	1.18e-68	*	13
	tiempo	3.72e-55	*	1
	Tratamiento: tiempo	3.00e-19	*	13

Cuadro 9. Resultado del ANOVA de medidas repetidas para las comparaciones del porcentaje de parálisis de todas las progenies de la cepa YY538 con exposición y la cepa N2 sin exposición: Efecto del tratamiento y el tiempo sobre el porcentaje de parálisis (Figura 16).

Cepas	Efecto	P	P<0.05	DFn
N2 (sin exposición) vs YY538	Tratamiento	1.92e-63	*	13
	tiempo	6.07e-51	*	1
	Tratamiento: tiempo	3.04e-13	*	13

XI. Referencias

1. Barnes, T. M., & Hekimi, S. (1997). The *Caenorhabditis elegans* Avermectin Resistance and Anesthetic Response Gene *unc-9* Encodes a Member of a Protein Family Implicated in Electrical Coupling of Excitable Cells. *Journal Of Neurochemistry*, 69(6), 2251-2260. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062251.x>
2. Brenner, S. (1974). The genetics of *caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
3. Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M. G., Chiueh, C. C., Clarkson, T. W., Cook, R. R., Diamond, D. M., Doolittle, D. J., Dorato, M. A., Duke, S. O., Feinendegen, L., Gardner, D. E., Hart, R. W., Hastings, K. L., . . . Mattson, M. P. (2007). Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 222(1), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.02.015>
4. Camacho, J., & Allard, P. (2018). Histone Modifications: Epigenetic Mediators of Environmental Exposure Memory. *Epigenetics Insights*, 11, 251686571880364. <https://doi.org/10.1177/2516865718803641>
5. Camacho, J., Truong, L., Kurt, Z., Chen, Y., Morselli, M., Gutierrez, G., Pellegrini, M., Yang, X., & Allard, P. (2018). The Memory of Environmental Chemical Exposure in *C. elegans* Is Dependent on the Jumonji Demethylases *jmjd-2* and *jmjd-3/utx-1*. *Cell Reports*, 23(8), 2392-2404. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.078>.
6. Chaya, T., Patel, S., Smith, E. M., Lam, A., Miller, E. N., Clupper, M., Kervin, K., & Tanis, J. E. (2021). AC. elegans genome-wide RNAi screen for altered levamisole sensitivity identifies genes required for muscle function. *G3 Genes Genomes Genetics*, 11(4). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab047>
7. Conrath, U., Beckers, G. J., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M. A., Pieterse, C. M., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., & Mauch-Mani, B. (2006). Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 19(10), 1062-1071. <https://doi.org/10.1094/mpmi-19-1062>
8. Ding, Y., Ochoa, H. J., Ishidate, T., Shirayama, M., & Mello, C. C. (2023). The nuclear Argonaute HRDE-1 directs target gene re-localization and shuttles to nuage to promote small RNA-mediated inherited silencing. *Cell Reports*, 42(5), 112408. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112408>
9. Espínola González, I. (2023). Mecanismos moleculares asociados con la herencia transgeneracional de la resistencia al estrés osmótico en *C.elegans* [Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Querétaro]. Repositorio institucional.

10. Foo, S. A., & Byrne, M. (2016). Acclimatization and Adaptive Capacity of Marine Species in a Changing Ocean. En *Advances in marine biology* (pp. 69-116). <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2016.06.001>
11. Frazier, H. N., & Roth, M. B. (2009). Adaptive Sugar Provisioning Controls Survival of *C. elegans* Embryos in Adverse Environments. *CB/Current Biology*, *19*(10), 859-863. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.066>
12. Geary, T. G., & Thompson, D. P. (2001). *Caenorhabditis elegans*: ¿how good a model for veterinary parasites? *Veterinary Parasitology*, *101*(3-4), 371-386. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00562-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00562-3).
13. Geerts, S., & Gryseels, B. (2001). Anthelmintic resistance in human helminths: a review. *TM & IH. Tropical Medicine And International Health/TM & IH. Tropical Medicine & International Health*, *6*(11), 915-921. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00774.x>
14. Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews. Genetics*, *10*(2), 94-108. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>
15. Greer, E. L., Maures, T. J., Hauswirth, A. G., Green, E. M., Leeman, D. S., Maro, G. S., Han, S., Banko, M. R., Gozani, O., & Brunet, A. (2010). Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature*, *466*(7304), 383-387. <https://doi.org/10.1038/nature09195>
16. Harish, E., & Osherov, N. (2022). Fungal Priming: Prepare or Perish. *Journal Of Fungi*, *8*(5), 448. <https://doi.org/10.3390/jof8050448>
17. Herz, H. M., Mohan, M., Garruss, A. S., Liang, K., Takahashi, Y. H., Mickey, K., Voets, O., Verrijzer, C. P., & Shilatifard, A. (2012). Enhancer-associated H3K4 monomethylation by Trithorax-related, the *Drosophila* homolog of mammalian Mll3/Mll4. *Genes & Development*, *26*(23), 2604-2620. <https://doi.org/10.1101/gad.201327.112>
18. Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Baurle, I., Geiselhardt, S., Hinch, D. K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M. C., Rolff, J., Romeis, T., Schmülling, T., Steppuhn, A., Van Dongen, J., Whitcomb, S. J., Wurst, S., Zuther, E., & Kopka, J. (2015). Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews/Biological Reviews Of The Cambridge Philosophical Society*, *91*(4), 1118-1133. <https://doi.org/10.1111/brv.12215>.
19. Holden-Dye, L. (2007). Anthelmintic drugs. *WormBook*, 1-13. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.143.1>
20. Iwakawa, H., & Tomari, Y. (2022). Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Molecular Cell*, *82*(1), 30-43. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.026>
21. James, C. E., Hudson, A. L., & Davey, M. W. (2009). Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends In Parasitology*, *25*(7), 328-335. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.04.004>
22. Jin, S., Zhan, J., & Zhou, Y. (2021). Argonaute proteins: structures and their endonuclease activity. *Molecular Biology Reports*, *48*(5), 4837-4849. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06476-w>
23. Kaminsky, R., Gauvry, N., Weber, S. S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., Goebel, T., Hosking, B. C., Pautrat, F.,

- Wieland-Berghausen, S., & Ducray, P. (2008). Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research*, *103*(4), 931-939. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1080-7>
24. Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends In Parasitology*, *20*(10), 477-481. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>
25. Kerr, S. C., Ruppertsburg, C. C., Francis, J. W., & Katz, D. J. (2014). SPR-5 and MET-2 function cooperatively to reestablish an epigenetic ground state during passage through the germ line. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, *111*(26), 9509-9514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321843111>
26. King, I. L., & Li, Y. (2018). Host–Parasite Interactions Promote Disease Tolerance to Intestinal Helminth Infection. *Frontiers In Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02128>.
27. Kishimoto, S., Uno, M., Okabe, E., Nono, M., & Nishida, E. (2017). Environmental stresses induce transgenerationally inheritable survival advantages via germline-to-soma communication in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms14031>
28. Klosin, A., Casas, E., Hidalgo-Carcedo, C., Vavouri, T., & Lehner, B. (2017). Transgenerational transmission of environmental information in *C. elegans*. *Science*, *356*(6335), 320-323. <https://doi.org/10.1126/science.aah6412>
29. Lee, T. W., David, H. S., Engstrom, A. K., Carpenter, B. S., & Katz, D. J. (2019). Repressive H3K9me2 protects lifespan against the transgenerational burden of COMPASS activity in *C. elegans*. *eLife*, *8*. <https://doi.org/10.7554/elife.48498>
30. Lev, I., Seroussi, U., Gingold, H., Bril, R., Anava, S., & Rechavi, O. (2017). MET-2-Dependent H3K9 methylation suppresses transgenerational small RNA inheritance. *CB/Current Biology*, *27*(8), 1138-1147. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.03.008>
31. Li, S., How, C. M., & Liao, V. H. (2018). Prolonged exposure of di(2-ethylhexyl) phthalate induces multigenerational toxic effects in *Caenorhabditis elegans*. *The Science Of The Total Environment*, *634*, 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.355>
32. Liu, H., Able, A. J., & Able, J. A. (2022). Priming crops for the future: rewiring stress memory. *Trends In Plant Science*, *27*(7), 699-716. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.11.015>
33. Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C. M., Pozo, M. J., Ton, J., Van Dam, N. M., & Conrath, U. (2016). Recognizing plant defense priming. *Trends In Plant Science*, *21*(10), 818-822. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.009>
34. Moore, R. S., Kaletsky, R., & Murphy, C. T. (2019). Piwi/PRG-1 Argonaute and TGF- β Mediate Transgenerational Learned Pathogenic Avoidance. *Cell*, *177*(7), 1827-1841.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.024>

35. Porta-De-La-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., & Cerón, J. (2012). Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation. *Journal Of Visualized Experiments*, 64. <https://doi.org/10.3791/4019>
36. Posit team (2023). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC, Boston, MA. URL <http://www.posit.co/>.
37. Liberman, N., Wang, S. Y., & Greer, E. L. (2019). Transgenerational epigenetic inheritance: from phenomena to molecular mechanisms. *Current Opinion In Neurobiology*, 59, 189-206. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.09.012>.
38. Ouyang, J. P. T., & Seydoux, G. (2021). Nuage condensates: accelerators or circuit breakers for sRNA silencing pathways? *RNA*, 28(1), 58-66. <https://doi.org/10.1261/rna.079003.121>
39. Rechavi, O., Hourri-Zeevi, L., Anava, S., Goh, W. S., Kerk, S. Y., Hannon, G. J., & Hobert, O. (2014). Starvation-Induced Transgenerational Inheritance of Small RNAs in *C. elegans*. *Cell (Cambridge)*, 158(2), 277-287. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.020>
40. Rechavi, O., & Lev, I. (2017). Principles of Transgenerational Small RNA Inheritance in *Caenorhabditis elegans*. *CB/Current Biology*, 27(14), R720-R730. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.043>
41. Rudgalvyte, M., Peltonen, J., Lakso, M., & Wong, G. (2016). Chronic MeHg exposure modifies the histone H3K4me3 epigenetic landscape in *Caenorhabditis elegans*. *Comparative Biochemistry And Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, 191, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.10.001>
42. Simonsen, K. T., Moerman, D. G., & Naus, C. C. (2014). Gap junctions in *C. elegans*. *Frontiers In Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00040>
43. Sternberg, P. W., Van Auken, K., Wang, Q., Wright, A., Yook, K., Zarowiecki, M., Arnaboldi, V., Becerra, A., Brown, S., Cain, S., Chan, J., Chen, W. J., Cho, J., Davis, P., Diamantakis, S., Dyer, S., Grigoriadis, D., Grove, C. A., Harris, T., . . . Stein, L. (2024). WormBase 2024: status and transitioning to Alliance infrastructure. *Genetics*, 227(1). <https://doi.org/10.1093/genetics/iyae050>
44. Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*.
45. Sze, C. C., & Shilatifard, A. (2016). MLL3/MLL4/COMPASS Family on Epigenetic Regulation of Enhancer Function and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine*, 6(11), a026427. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026427>
46. Taki, F. A., Pan, X., & Zhang, B. (2013). Nicotine exposure caused significant transgenerational heritable behavioral changes in *Caenorhabditis elegans*. *PubMed*, 12, 793-806. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26600738>
47. Taki, F. A., Pan, X., Lee, M., & Zhang, B. (2014). Nicotine exposure and transgenerational impact: a prospective study on small regulatory microRNAs. *Scientific Reports*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/srep07513>
48. Tolia, N. H., & Joshua-Tor, L. (2006). Slicer and the Argonautes. *Nature Chemical Biology*, 3(1), 36-43. <https://doi.org/10.1038/nchembio848>
49. Vasale, J. J., Gu, W., Thivierge, C., Batista, P. J., Claycomb, J. M., Youngman, E. M., Duchaîne, T. F., Mello, C. C., & Conte, D. (2010). Sequential rounds of RNA-dependent RNA transcription drive endogenous small-RNA biogenesis in the ERGO-1/Argonaute pathway. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The*

United States Of America, 107(8), 3582-3587. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911908107>

50. Wang, L., Aberin, M. A. E., Wu, S. M., & Wang, S. (2021). The MLL3/4 H3K4 methyltransferase complex in establishing an active enhancer landscape. *Biochemical Society Transactions*, 49(3), 1041-1054. <https://doi.org/10.1042/bst20191164>
51. Wan, Q., Meng, X., Wang, C., Dai, W., Luo, Z., Yin, Z., Ju, Z., Fu, X., Yang, J., Ye, Q., Zhang, Z., & Zhou, Q. (2022). Histone H3K4me3 modification is a transgenerational epigenetic signal for lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28469-4>
52. Weinhouse, C., Truong, L., Meyer, J. N., & Allard, P. (2018). *Caenorhabditis elegans* as an emerging model system in environmental epigenetics. *Environmental And Molecular Mutagenesis*, 59(7), 560-575. <https://doi.org/10.1002/em.22203>
53. Willis, A. R., Sukhdeo, R., & Reinke, A. W. (2020). Remembering your enemies: mechanisms of within-generation and multigenerational immune priming in *Caenorhabditis elegans*. *The FEBS Journal*, 288(6), 1759-1770. <https://doi.org/10.1111/febs.15509>
54. Yu, C., & Liao, V. H. (2016). Transgenerational Reproductive Effects of Arsenite Are Associated with H3K4 Dimethylation and SPR-5 Downregulation in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science & Technology*, 50(19), 10673-10681. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02173>
55. Zhou, L., He, B., Deng, J., Pang, S., & Tang, H. (2019). Histone acetylation promotes long-lasting defense responses and longevity following early life heat stress. *PLOS Genetics*, 15(4), e1008122. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008122>