



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CARACTERIZACIÓN DE LOS MECANISMOS MOLECULARES INDUCIDOS POR  
ALTA GLUCOSA EN EL SISTEMA NERVIOSO DE C. ELEGANS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
MARIANA ZURITA LEÓN

TUTOR:  
DR. V. JULIÁN VALDÉS RODRÍGUEZ  
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

COMITE TUTOR:  
DRA. LEONOR PÉREZ MARTINÉZ  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA  
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. 03, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Indice**

**Resumen**

**Abstract**

**Agradecimientos**

**Introducción**

**Efectos de la exposición a glucosa en los organismos**

**Efectos de la hiperglucemia en el sistema nervioso**

***Ceanorhabditis elegans* como modelo en biomedicina**

**Sistema nervioso de *C. elegans***

**Transgeneracionalidad**

**Vías de respuesta al ambiente conservadas en *C. elegans***

**Vía tipo insulina**

**CRH-1/CREB**

**Vía de SKN-1/NRF**

**Vía de HIF-1**

**Regulación por marcas de histonas**

**Antecedentes directos**

**Hipotesis**

**Objetivo**

**Metodos**

**Resultados**

**Discusión**

**Conclusiones**

**Perspectivas**

**Figuras Suplementarias**

## Resumen

La diabetes y la obesidad son dos de los mayores problemas de salud en la actualidad. Ambos están asociados con dietas altamente calóricas y sedentarismo, causando así un incremento en los niveles de glucosa sanguínea. La exposición a altos niveles de glucosa tiene efectos negativos en distintos tejidos incluyendo el sistema nervioso. Se ha reportado que la hiperglucemia en niveles patológicos causa un decremento en la memoria y las habilidades cognitivas, a la vez que aumenta el riesgo de enfermedades neurodegenerativas; sin embargo, hasta ahora los mecanismos detrás de estos efectos son poco entendidos. Así mismo, los efectos de una exposición crónica a altos niveles de glucosa sobre la progenie y generaciones subsecuentes no se conocen por completo. Usando al nemátodo *Caenorhabditis elegans* como modelo de exposición a glucosa, analizamos los efectos de la glucosa sobre la memoria asociativa y conducta, en particular la preferencia a odorantes. Se observó que la exposición a glucosa afecta la conducta a el odorante benzaldehído dependiente de la vía tipo insulina, SET-30 y del factor transcripcional HIF-1. De igual manera determinamos que la exposición crónica a glucosa, por cinco generaciones, causa cambios conductuales al benzaldehído e impide el establecimiento de una memoria asociativa a este odorante de manera transgeneracional. Finalmente observamos que tanto la exposición crónica como aguda a glucosa causa cambios transcripcionales, los cuales se mantienen de manera transgeneracional en el caso de la exposición crónica. Nuestros resultados sugieren que la exposición a glucosa causa cambios conductuales en animales, los cuales se mantienen de manera transgeneracional ante una exposición crónica. Estos resultados hacen evidente la urgencia de controlar la epidemia de obesidad y diabetes no solo para prevenir las patologías asociadas en las personas afectadas, sino para prevenir afectaciones futuras.



## Abstract

Diabetes and obesity are two leading causes of health issues worldwide. Both are associated with high-caloric diets and a sedentary lifestyle which cause an increase in blood glucose levels. High glucose exposure has negative effects on diverse tissues including the nervous system. In humans, exposure to elevated glucose decreases memory and cognitive function while increasing the risk of neurodegenerative disorders; yet, the mechanisms behind these effects are unclear. Furthermore, the effects of glucose exposure on future generations are not characterized. It is known that nutritional stimuli affect future generations and reflect the overall healthspan of the individuals. Using the nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for glucose exposure, we have analyzed the effects of such exposure on associative memory and behavior to odorants. We discovered that glucose exposure affects basal chemotaxis via the insulin-like pathway, SET-30, and HIF-1. We also determined that chronic exposure to glucose causes behavioral changes and impairs associative memory in a transgenerational manner. Finally, we observed that both chronic and acute exposure to glucose causes transcriptional changes which are maintained transgenerationally. Our results suggest that nutritional stimuli can alter behaviour, and have transgenerational consequences.

## **Agradecimientos**

Esta tesis se desarrolló bajo la tutoría del Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez, en el laboratorio 302 Oriente del departamento de Biología Celular y Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El comité tutor estuvo conformado por:

Dr. Víctor Julián Valdés Rodríguez  
Dra. Leonor Pérez Martínez  
Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

El presente trabajo contó con financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto “CB-2016-01 No. 0284867”, así como por la Dirección de Asuntos del Personal Académico PAPIIT No. IN203820. Además, se contó con una beca para estudios de posgrado otorgada por el CONACyT con el número de becario 930716.

Este trabajo contó con las valiosas correcciones y aportaciones de los miembros del jurado:

Dra. Andrea Diaz-Villaseñor  
Dra. Rosa Estela Navarro  
Dra. Ingrid Annette Fetter Pruneda  
Dr. Juan Miranda Ríos  
Dr. David Orozco Solis

Se reconoce a la Dra. Nallely Cano Domínguez por su valiosa asistencia técnica durante la realización de este trabajo.

De igual manera se reconoce la participación del M. en C. Martí Wilson Verdugo por su aportación en el análisis inicial de los datos de secuenciación de RNA.

Fueron utilizados los servicios de la Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular, de la cual se agradece la asesoría y disposición de la Dra. Ruth Rincón Heredia y del Dr. Abraham Rosas Arellano.

Finalmente, se reconoce a la Dra. Laura Ongay Larios, la Bióloga María Guadalupe Códiz Huerta y la M. en C. Minerva Mora Cabrera, por los servicios ofrecidos en la Unidad de Biología Molecular y al Dr. Cesar Poot de la Unidad de Manejo de la Información del IFC. También se agradece a los miembros de la Unidad de Cómputo y del taller de Mantenimiento del IFC.



## Introducción

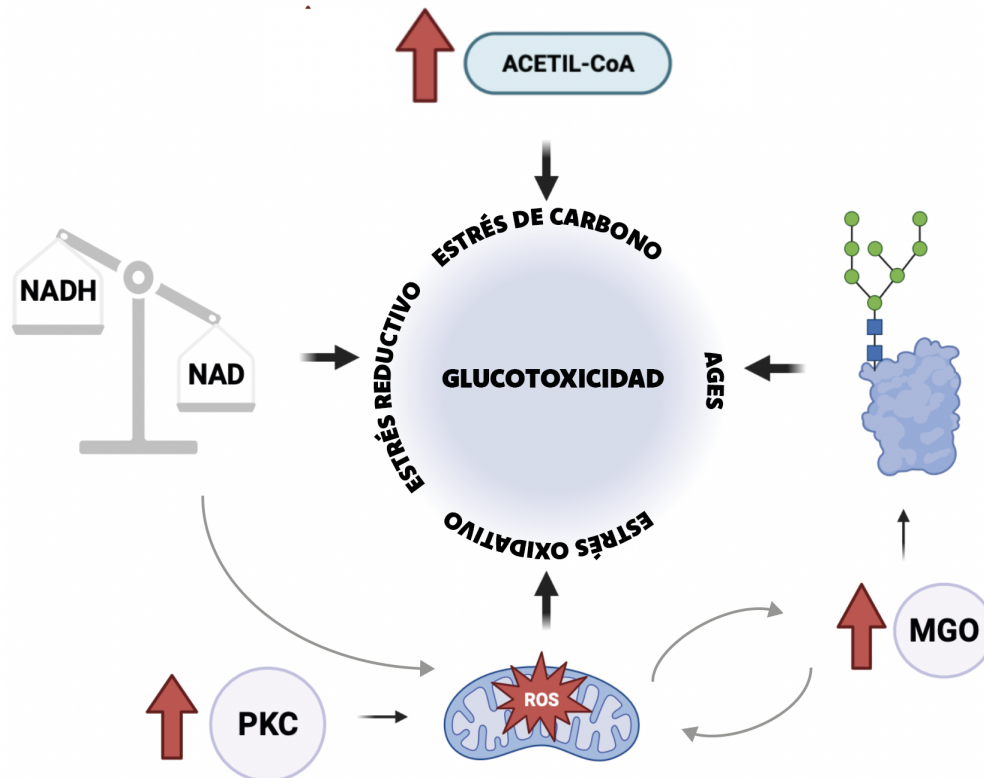
### Efectos de la exposición a glucosa en los organismos

Una de las mayores problemáticas de salud es la alta incidencia de diabetes mellitus y obesidad en la población mundial. En particular en México, el 75% de la población adulta y 35% de los niños tienen obesidad, mientras que hay aproximadamente 60,000 mexicanos diagnosticados con diabetes (ENSANUT, 2018; Rojas-Martinez, *et al.*, 2018). La diabetes tipo 2 es una enfermedad metabólica caracterizada por la resistencia a insulina, la cual deriva de una insensibilidad a esta hormona seguida de un decremento en la producción de esta y muerte de las células beta pancreáticas. Como resultado de la resistencia a la insulina hay un decremento del transporte de glucosa a células musculares, adiposas y hepáticas, causando que se degraden los ácidos grasos y aumente la concentración de glucosa en la sangre creando un estado patológico (Kahn, 1995; Robertson, 1995). La diabetes tipo 2 está altamente relacionada con el estilo de vida resultando en que el 55% de los casos de esta enfermedad están asociados con obesidad (CDC, 2004). Es decir que, tanto la obesidad como la diabetes tipo 2 se asocian a un aumento en la ingesta calórica, la cual tiene como consecuencia estados hiperglucémicos (Mouri & Badireddy, 2020; Qi, 2009). La hiperglucemia se determina como una elevada concentración de glucosa en la sangre, que en ayuno debe de ser superior a 125 mg/dL, y en postprandia debe de ser de 180 mg/dL (Veras-Estévez *et al.*, 2018). Se conoce que la hiperglucemia tiene como consecuencia un deterioro en el tejido vascular que culmina en fallas de distintos sistemas, tales como el sistema cardiovascular y el sistema nervioso (Aronson, 2008). Debido a los efectos de la hiperglucemia sobre diferentes órganos, incluyendo el sistema nervioso central, esta condición presenta una problemática compleja cuyos efectos aún no se terminan de entender.

Aunque los efectos de la hiperglucemia sobre el organismo no se entienden en su totalidad, parte del deterioro celular ha sido atribuido a un fenómeno determinado como la glucotoxicidad. La glucotoxicidad es la desregulación de diversas vías metabólicas y cascadas de regulación derivadas de la exposición prolongada a la glucosa llevando al deterioro y muerte celular (Fig 1) (Luo *et al.*, 2016). Se considera que la glucotoxicidad está causada por cuatro principales factores. **El primero** es el aumento en el estrés reductivo, el cual es causado por un desbalance entre las pozas de NAD/NADH (Lipinski, 2002). En estados de hiperglucemia la vía de poliol se activa para desechar el exceso de glucosa. La vía de poliol consiste en dos reacciones bajo las cuales se consume NADPH y se produce NADH. En condiciones de hiperglucemia el aumento en la actividad de esta vía causa un aumento en el NADH celular que lleva a un estado de pseudo hipoxia (Tang *et al.*, 2012). Como consecuencia de este estrés reductivo hay una desregulación en vías de señalización, se afectan las enzimas que requieren NAD, y aumenta el estrés oxidativo (Luo *et al.*, 2016). **El segundo** factor asociado con la glucotoxicidad es el

aumento en el estrés oxidativo celular, el cual tiene un papel importante en las comorbilidades asociadas a la diabetes (Wolf, 1993). El estrés oxidativo en condiciones de hiperglucemia se origina por la desregulación de las vías de la hexosamina, el poliol y el enediol, al igual que un aumento en la proteína quinasa C. En condiciones basales la mitocondria es la fuente principal de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs); sin embargo, durante estados hiperglucémicos hay un aumento del NADH celular que causa un incremento en la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones (Coughlan *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2016). Dicho aumento en la actividad mitocondrial es resultado de que la vía del poliol se encuentra desregulada resultando en un aumento en la producción de iones superóxidos. **El tercer factor** asociado con la glucotoxicidad es el aumento en la generación de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés) (Hayden, 2002; Brownlee 2001). El origen de los AGEs se debe al aumento en dicarbonilos reactivos, sobre todo el glioxal, metilglioxal (MGO), y 3-deoxiglucosona (Zheng *et al.*, 2016). Los productos reducidos de la glucosa reaccionan principalmente con las lisinas de las proteínas, e incluso pueden causar daño en el DNA. Principalmente el MGO se ha asociado con defectos en mitocondria en diabetes (Zheng *et al.*, 2016). El aumento de los AGEs a su vez aumenta el estrés oxidativo. Esto se ha observado en microglia, donde existe un aumento de la NADPH oxidasa NOX2 cuando hay un aumento en los AGEs. Finalmente, **el cuarto factor** es un aumento en el estrés del carbono derivado del exceso de acetil coenzima A y del fumarato derivado de altas concentraciones de glucosa que entran al ciclo de Krebs (Blatnik *et al.*, 2008; Luo, 2016; Olefsky, 1993). El estrés del carbono afecta la estabilidad y actividad de proteínas ya que hay una sobre acetilación y succinación de estas (Blatnik *et al.*, 2008). El resultado de todas estas alteraciones es que en condiciones de hiperglucemia hay un aumento en la inflamación, estrés inflamatorio, estrés reductor, estrés metabólico y oxidativo al igual que estrés amiloide. Estas condiciones de toxicidad se han observado en células pancreáticas, adipocitos y modelos murinos (Halban *et al.*, 2014; Christensen *et al.*, 2019).

Se considera que los tejidos que se ven más afectados por estados hiperglucémicos prolongados son la macrovasculatura y la microvasculatura, llevando así a patologías en diversos órganos (Brownlee, 2001). Se conoce poco de cómo estados hiperglucémicos prolongados afectan otros tejidos no vasculares tales como neuronas. Por medio de trabajos con líneas celulares se ha observado que los efectos de la exposición a glucosa afectan directamente a las células; sin embargo, existen pocos estudios en organismos completos debido a que no es fácil diferenciar los efectos dados por el daño en la vasculatura del tejido de los daños de las células del tejido causados directamente por la hiperglucemia.



**Figura 1. Vías metabólicas desreguladas causantes de la glucotoxicidad.** La exposición a altas concentraciones de glucosa por un tiempo prolongado genera un aumento en el estrés reductivo por el aumento del acetil CoA y fumarato intracelular. De igual manera existe un aumento en los productos de glicación avanzada (AGEs) por el aumento de dicarbonilos reactivos, principalmente el metilglioxal (MGO). Así mismo aumenta el estrés oxidativo por actividad mitocondrial derivada del aumento en la proteína cinasa C, NADH intracelular, y dicarbonilos reactivos. Hay también un aumento en el estrés reductivo causado por un aumento en el NADH intracelular. El estrés reductivo, estrés de carbono, aumento en AGEs y el estrés oxidativo son los cuatro factores principales causantes de la glucotoxicidad.

### Efectos de la hiperglucemia en el sistema nervioso

El sistema nervioso es particularmente sensible a ser afectado por estados de hiperglucemia patológica. La diabetes y la obesidad están relacionadas con un incremento en el riesgo de neuropatías como la neuropatía hiperglucémica y la neuropatía autonómica (Tomas & Watkins, 1998). Así mismo, la diabetes está asociada con un decremento de 1.2 veces en las capacidades cognitivas, esto sobre todo en personas que han vivido un largo periodo de tiempo con la enfermedad mal controlada (Cuckierman *et al.*, 2005; McCrimmon *et al.*, 2012). De igual manera, pacientes con diabetes tienen un aumento que va de 1.43 a 1.62 veces en el riesgo relativo de desarrollar demencia (Cheng *et al.*, 2012; Chatterjee *et al.*, 2016; Xue *et*

al., 2019). Se ha observado que entre más temprano en la vida comienza la enfermedad, existe una mayor asociación con demencia al igual que con sufrir embolias cerebrales (Barbiellini et al., 2021). Una de las explicaciones respecto a la correlación entre diabetes y demencia es que hay receptores de insulina en el cerebro los cuales son cruciales para el correcto funcionamiento del SN; sin embargo, aún no se entiende completamente cómo ambas patologías están relacionadas (Rao et al., 2011). Otras explicaciones sobre las deficiencias cognitivas observadas en pacientes con diabetes están relacionadas con un decremento en la masa del hipocampo y con alteraciones metabólicas (Gold et al., 2007).

Existen datos de pacientes con enfermedad de Alzheimer y diabetes que presentan un mayor contenido de AGEs en el sistema nervioso, al igual que un incremento en la actividad de la microglia debido a la presencia de los AGEs en las neuronas (Umegaki, 2014). Por otra parte, se ha observado que pacientes con diabetes tipo 2 presentan un decremento en la síntesis de serotonina y alteraciones en los receptores serotoninérgicos (Pingalosa et al., 2021) aunque la causa no está del todo caracterizada. El tejido vascular es uno de los tejidos que se ve más afectado en hiperglucemia persistente y se sabe que es causante de daños en el sistema nervioso periférico, por lo que también ha sido propuesto para explicar los daños en el sistema nervioso central y las alteraciones neurológicas reportadas (Umegaki, 2014). De hecho, daños asociados a hiperglucemia en la vasculatura del SN son considerados como causantes de infartos, microinfartos cerebrales e isquemias (Adeshara et al., 2016; Umegaki, 2014).

Para el mejor entendimiento de los efectos de la hiperglucemia en el sistema nervioso se han desarrollado algunos modelos animales. En ratas, se ha observado que individuos alimentados con dietas altas en grasa tienen un decremento en diversos paradigmas de memoria como el laberinto radial de Olton, y el laberinto acuático de Morris (Greenwood & Winocur, 1990; Chen et al., 2017). De igual manera, se ha observado un decremento en el aprendizaje espacial en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Biessels et al., 1996). En modelos murinos se han analizado los efectos de la hiperglucemia sobre neurotransmisores donde, al igual que en humanos, se ha observado que ratones con diabetes inducida por estreptozotocina tienen un decremento de serotonina en diversas estructuras cerebrales, lo cual se ha explicado en parte por un aumento en la recaptura de serotonina (Pingalosa et al., 2021). Similarmente, se ha encontrado un decremento en la cantidad de dopamina en el núcleo estriado en este modelo (Pérez-Taboada et al., 2020). Se considera que los efectos observados sobre la neurotransmisión de dopamina están relacionados con la desregulación de la insulina en el cerebro, ya que esta protege y mantiene la homeostasis de neuronas dopaminérgicas (Pang et al., 2016; Könnner et al., 2011). Como se mencionó anteriormente, la glucotoxicidad causada por hiperglucemia conlleva a un aumento en dicarbonilos reactivos que producen AGEs. Uno de los dicarbonilos reactivos con mayor reactividad, y que se encuentra aumentado en el plasma sanguíneo de pacientes de diabetes son los

alfa-ceto aldehídos MGO. Se ha observado que la exposición a MGO causa un aumento en la apoptosis de neuronas del hipocampo de ratas, lo que puede estar implicado en el déficit cognitivo (Huang *et al.*, 2012; Hansen *et al.*, 2016).

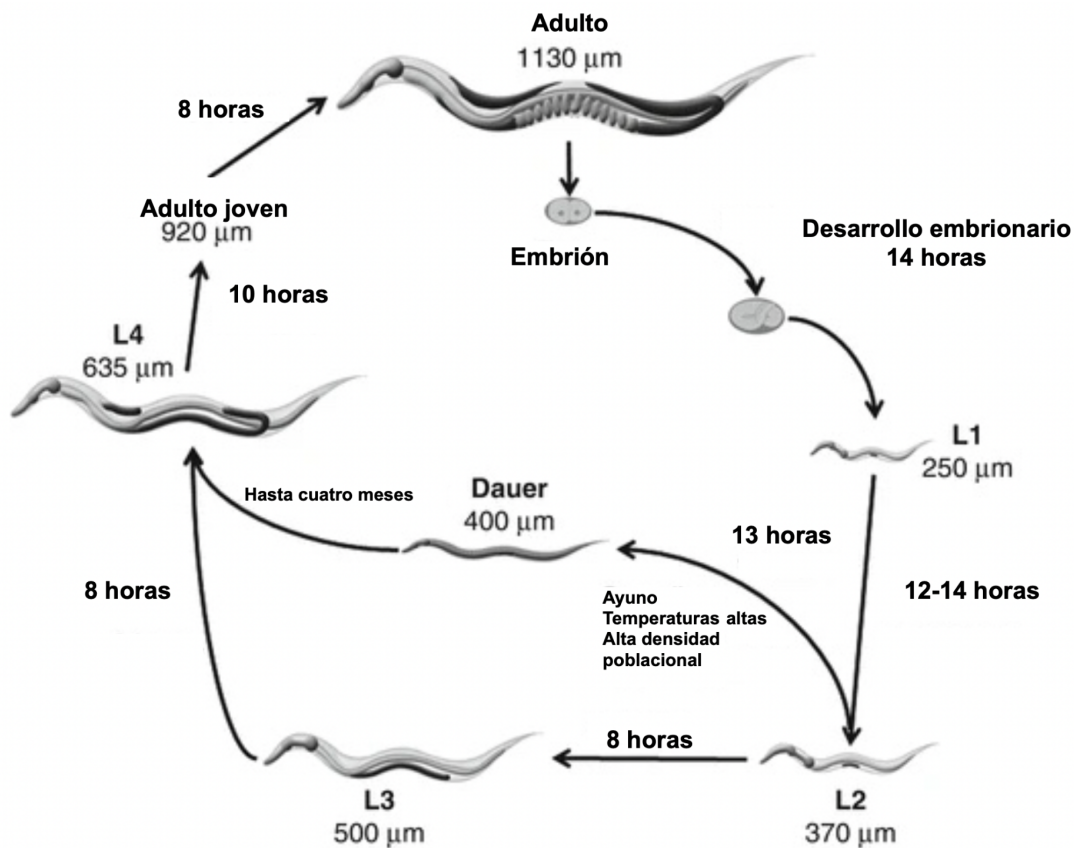
Una de las hipótesis más exploradas es que las afecciones en el sistema nervioso en estados hiperglucémicos resultan de daños sobre la vasculatura (Umegaki, 2014). En particular se ha propuesto que la hiperglucemia afecta la barrera hematoencefálica llevando a filtraciones del contenido de los vasos sanguíneos al sistema nervioso. Sin embargo, estudios en ratones han demostrado que una hiperglucemia prolongada no compromete la barrera hematoencefálica por lo que hay datos contradictorios al respecto de este mecanismo, y por lo tanto no se puede utilizar como la única explicación ante los daños del sistema nervioso (Janelidze *et al.*, 2017; Maë *et al.*, 2018). Debido a que los organismos más utilizados para estudiar los efectos de la exposición de glucosa en el sistema nervioso son modelos murinos, ha sido complicado diferenciar si los efectos negativos de la hiperglucemia son inducidos por daños sobre la microvasculatura, o bien, por la exposición directa de las células del sistema nervioso a concentraciones patológicas de glucosa. Por lo tanto, es importante generar modelos animales de exposición a glucosa en organismos que no presenten vasculatura, para así disectar los mecanismos moleculares y celulares que ocurren en el sistema nervioso ante la presencia de altas concentraciones de glucosa.

### **El nematodo *Caenorhabditis elegans* como modelo en biomedicina**

*Caenorhabditis elegans* es un nematodo de vida libre no patógeno perteneciente a la familia Rhabditidae. Este nematodo presenta dos sexos: machos (XO) y hermafroditas (XX), donde las hermafroditas son el 99.9% de la población. El ciclo de vida de *C. elegans* está compuesto por un estadio embrionario seguido de cuatro estadios larvarios, y el estadio adulto (Fig 2). A 20 °C, el estadio embrionario dura 24 horas. El primer estadio larvario, L1, dura aproximadamente 16 horas. Posteriormente los siguientes estadios larvarios, L2, L3 y L4 tienen una duración de aproximadamente 12 horas. Una vez concluida la etapa larvaria de L4, el nematodo llega al estadio adulto. Ante distintos estresores ambientales los nemátodos pueden entrar a estados de diapausa. El estado larvario de diapausa más estudiado es la larva dauer, donde ante un alto nivel poblacional, ayuno o altas temperaturas en las últimas etapas de L2 se activa la señalización para entrar al estadio L2d y posteriormente a dauer (Cassada & Russel, 1975; Riddle, 1988). La larva dauer es un estado hipometabólico con características morfológicas como el engrosamiento de la cutícula, el bloqueo de la cavidad oral por cutícula y delgadez de los nemátodos entre otras. En el caso de que se reviertan los estímulos ambientales adversos, los nemátodos salen de dauer y pasan a la etapa larvaria L4. Los nemátodos también pueden entrar en estado de diapausa reproductiva adulta (ARD por sus siglas en inglés) (Angelo & van Glist, 2009).



Las hermafroditas adultas producen alrededor de 300 embriones provenientes en su mayoría por autofertilización, en un periodo de dos a tres días (Corsi *et al.*, 2015). Su corto ciclo de vida, fácil manutención, progenie abundante y contar con un soma transparente, han convertido a *C. elegans* un modelo de estudio para diversos aspectos de biología del desarrollo y molecular.

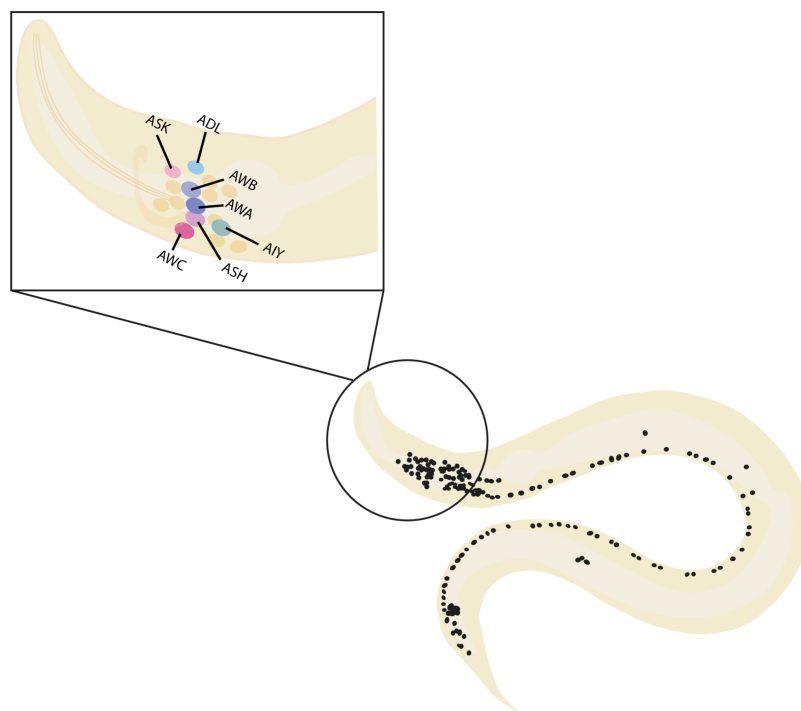


**Figura 2. Ciclo de vida del nematodo *C. elegans*.** En la figura se muestra el ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C el cual atraviesa por cuatro estadios larvarios (L1-L4) antes de llegar a adulto en 72 hrs. En el centro se puede observar uno de los estadios alternativos de desarrollo: la etapa dauer, que es inducido por diversos estresores ambientales. Modificado de: Vergara-Irigaray N., Riesen M. (2012).

### Sistema nervioso de *C. elegans*

El sistema nervioso de las hermafroditas de *C. elegans* está compuesto por 302 neuronas las cuales se encuentran completamente mapeadas (Hall *et al.*, 1991). Este sistema nervioso está compuesto por ganglios que se encuentran en la faringe y la cola del nemátodo (Fig. 3). Entre los ganglios localizados en la faringe destaca el anillo nervioso, al cual se proyectan 180 axones y procesos de las 302 neuronas del sistema nervioso que le permiten al gusano evaluar distintas condiciones

ambientales (Chitwood & Chitwood, 1950). A la fecha se conocen los circuitos neuronales que participan en varios procesos del organismo tales como la atracción a odorantes, aversión a bacterias, e incluso mecanismos de cópula (Bragmann, Hartwelg & Horvitz, 1993; Bargmann & Mori, 1997; Pirce-Shimomura, *et al.*, 2001). Recientemente se caracterizó el conectoma completo ambos sexos de *C. elegans* mediante reconstrucciones por microscopía electrónica (Cook *et al.*, 2019). La manera más común de clasificar neuronas en *C. elegans* es por anatomía, donde existen 118 distintas clases (Hobert, 2010). El sistema nervioso de *C. elegans* utiliza la mayoría de los neurotransmisores presentes en mamíferos: GABA, acetilcolina, serotonina, dopamina y glutamato (Hobert, 2013). En 2010 se reportó el transcriptoma de cada tipo neuronal (Hobert *et al.* (2010) donde se caracterizó que las neuronas del nematodo el perfil transcricional de cada neurona.



**Figura 3. Sistema nervioso de la hermafrodita de *C. elegans*.** Dibujo representativo del sistema nervioso de la hermafrodita de *C. elegans* compuesto por 302 neuronas organizadas en ganglios a lo largo del cuerpo. Se recalcan algunas de las neuronas quimiosensoras localizadas en los ganglios de la cabeza.

El linaje del sistema nervioso de *C. elegans* se encuentra completamente descrito y se ha caracterizado que las neuronas del nematodo provienen de distintos linajes, es decir que son no clonales (Sulston *et al.*, 1983). En el caso de las neuronas sensoriales del sistema anfidio, estas provienen de distintos linajes, por lo que tienen características morfológicas y fisiológicas variadas. Los genes reguladores de la especificación neuronal se han descrito debido al uso de mutantes con fenotipos característicos y en particular se han logrado describir mutantes de la especificación de neuronas relacionadas con conductas: *unc-30*, neuronas locomotoras (Jin *et al.*,

1994); *ttx-3*, regula neuronas termosensoras (Hobert *et al.*, 1997; Hedgehock & Russell, 1975); y *che-3*, neuronas quimiosensoras (Chang *et al.*, 2003, Uchida *et al.*, 2003), entre otros.

*C. elegans* es un excelente modelo para el estudio del sistema nervioso dado que sus diversas conductas están altamente estudiadas, de hecho, presenta comportamientos complejos como aprendizaje asociativo, no asociativo, y memoria a corto y largo plazo (Katz & Shaham, 2019; Rankin *et al.*, 1990). En su ambiente natural *C. elegans* detecta diversas moléculas volátiles y solubles que causan respuestas conductuales como la atracción o repulsión a la molécula. Estas conductas se han determinado como conductas de quimiotaxis, donde los estímulos son reconocidos por receptores acoplados a proteínas G en neuronas específicas (Bargmann & Mori, 1997; Tromel, 1997). En general las conductas hacia dichos compuestos se dividen en conductas de atracción, en las cuales los nematodos se mueven hacia el compuesto, y conductas de aversión.

Se ha caracterizado que el nematodo es capaz de reconocer los estímulos químicos mediante 11 pares de neuronas quimiosensoras que se encuentran en órganos anfidos cerca de la faringe del animal (Ward *et al.*, 1975). En el caso de los odorantes volátiles, estos son reconocidos por las neuronas quimiosensoras AWB, AWC y AWA (Wes & Bargmann, 2001). Las neuronas quimiosensoras se caracterizan por presentar cilios que protuden hasta la cutícula, la cual los odorantes volátiles son capaces de permear para llegar a sus respectivos receptores. Dos de las conductas más estudiadas en *C. elegans* son las respuestas a los odorantes 2-butanona y alcohol isoamílico. Ambos odorantes son detectados por la neurona AWC. Por otra parte, el odorante benzaldehído, un aldehído aromático, es detectado por las neuronas AWA y AWC (Wes & Bargmann, 2001). *C. elegans* también puede detectar compuestos asociados a patógenos o depredadores lo que resulta en su huida de la zona de peligro, es decir, en una conducta aversiva. Estas conductas aversivas se encuentran mediadas por las neuronas ASH, ADL, AWB y ASK. Un ejemplo de una conducta aversiva es la respuesta a sales, SDS y quinina (Bragmann *et al.*, 1990; Hilliard *et al.*, 2004). En el caso particular del odorante benzaldehído, solo se ve este comportamiento en altas concentraciones de este; sin embargo, a baja concentración le resulta atractivo (Tromel *et al.*, 1997; Nuttley *et al.*, 2001).

El estudio de las conductas específicas de *C. elegans* ha permitido que se establezcan distintos paradigmas de memoria y aprendizaje los cuales pueden ser paradigmas asociativos o no asociativos. En el caso de la memoria asociativa, los paradigmas consisten en la asociación de dos estímulos no relacionados para llevar a una conducta. Dentro de los paradigmas de memoria asociativa existen aquellos que se basan en la impronta, el cual es una memoria a largo plazo que ocurre al exponer a los organismos durante un periodo determinado del desarrollo que resulta en cambios conductuales posteriores. En *C. elegans* uno de los paradigmas de

impronta conductual mejor estudiados es hacia el odorante benzaldehído y comida (Remy & Hobert, 2005). El benzaldehído es un aldehído aromático que se produce en frutos y semillas y que en vida silvestre se encuentra en fuentes de comida para el nematodo. Como se mencionó, los nemátodos presentan una conducta de atracción hacia el odorante, pero esta aumenta si los nemátodos son expuestos al odorante durante 24 horas posteriores a su ovoposición en presencia de comida (Trommel *et al.*, 1997; Nuttley *et al.*, 2001; Remy & Hobert, 2005). Se ha caracterizado que la atracción al benzaldehído está mediada por el neurotransmisor serotonina, lo cual involucra a los receptores de serotonina SER-1, SER-4 y SER-7 y al canal de cloro mediado por serotonina MOD-1 (Colbert & Bargmann, 1997; Olde & McCombie, 1997; Ragnathan *et al.*, 2000). Como se mencionó, este odorante causa una atracción basal en los nemátodos cuando se encuentra en concentraciones bajas pero nemátodos que previamente fueron expuestos al odorante muestran una mayor quimioatracción a este (Remy & Hobert, 2005). Este proceso de *imprinting* se encuentra mediado por la interacción del par de neuronas AWC y la interneurona AIY de *C. elegans* (Adriel & Rankin, 2010).

### **Transgeneracionalidad**

En los últimos años se ha reportado que algunas experiencias de vida de algunos organismos pueden afectar a las siguientes generaciones. Durante las divisiones mitóticas y meióticas la herencia ocurre no solo a nivel genético, si no también en la estructura y modificaciones de la cromatina, es decir a nivel epigenético (Heard & Martienssen, 2014). Este tipo de herencia epigenética se considera como intergeneracional cuando sólo perdura por tres generaciones, mientras que, si pasa a la cuarta generación, se considera herencia epigenética transgeneracional, esto pues es hasta después de la cuarta generación que se asegura que los gametos no estuvieron expuestos al ambiente original. Desde el punto de vista evolutivo, la herencia intergeneracional puede considerarse como favorable para la especie ya que favorecen la adaptabilidad de la descendencia al medio ambiente promoviendo la supervivencia de la especie (Burton *et al.*, 2020).

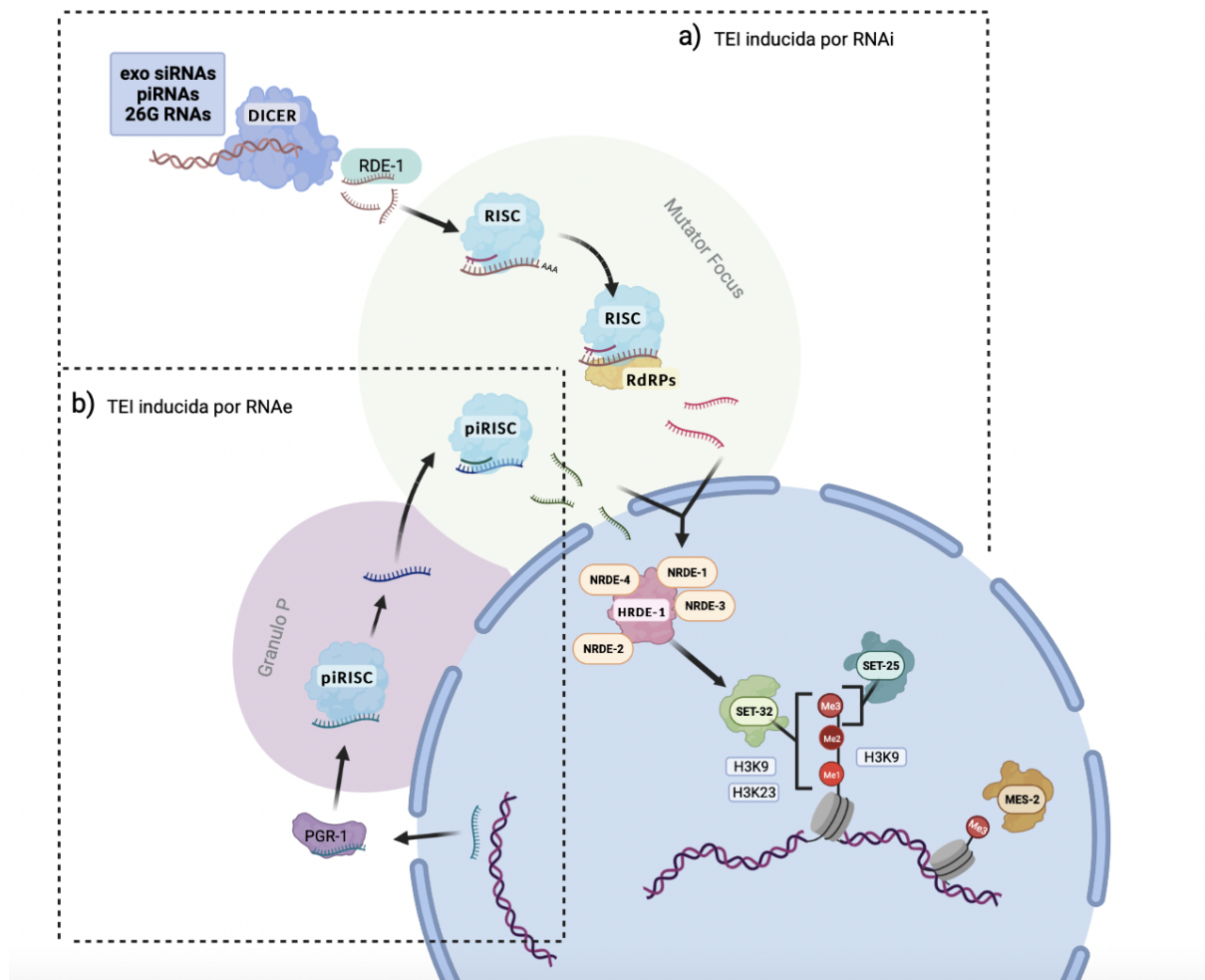
La herencia epigenética transgeneracional ocurre ante diversos estímulos ambientales. Por ejemplo, el estado nutricional en el que se encuentra un organismo puede afectar por medio de herencia epigenética transgeneracional a sus descendientes. En particular existen distintos estudios realizados en modelos murinos de cómo un tratamiento de exposición a alta glucosa o grasa en generaciones parentales (P0), tiene efectos sobre las siguientes generaciones (Dunn & Bale, 2011; Fullston *et al.*, 2013). La exposición a dietas altas en grasa en hembras de ratón produce un aumento en el tamaño corporal de la F3 (Dunn & Bale, 2011). De igual manera, en ratones, se ha observado que la exposición a dietas altas en grasa de machos causa un aumento en la adiposidad y un decremento en la metilación global del genoma de la F2 (Fullston *et al.*, 2013). También se ha observado que la progenie de ratas expuestas a hiperglucemia

presentan un aumento de apoptosis en el hipocampo causando problemas en el aprendizaje (Ghafari et al., 2016). Los efectos transgeneracionales sobre el metabolismo también pueden ocurrir a raíz de la exposición a agentes toxicológicos. En ratas, la exposición a cadmio y mercurio en la generación parental tiene como resultado un incremento en la adiposidad abdominal, y aumenta la resistencia a la glucosa hasta la generación F4 (Camsari et al., 2019). De igual manera la exposición de ratas a compuestos químicos, que tienen efectos sobre el sistema endocrino (tales como el BPA, DBP y EHBP), aumentan la susceptibilidad a obesidad en la F3 y afectan la metilación del DNA en genes importantes para el metabolismo (Manikkam et al., 2013).

Debido a su corto ciclo de vida y a su fácil manejo, el nemátodo *C. elegans* ha surgido como uno de los principales modelos para el estudio de la herencia transgeneracional en animales. Existen distintos fenómenos de herencia transgeneracional e intergeneracional en el nematodo *C. elegans* donde se conocen parte de los mecanismos moleculares relacionados en ambos procesos. En el nematodo se ha observado que tanto conductas como respuestas a estrés pueden ser heredados transgeneracionalmente. En el caso de estrés nutricional los estímulos de ayuno durante el estadio L1 resultan en un aumento de la longevidad que se puede observar de manera transgeneracional en la progenie de los nematodos (Rechavi et al., 2014). Por otra parte, los nematodos expuestos a dietas altas en grasas originan un aumento en la acumulación de lípidos, un aumento en la cantidad de DNA mitocondrial, y un aumento en los niveles de H3K4me3 de manera intergeneracional (Wan et al., 2022). Otro ejemplo de transgeneracionalidad se ha observado al exponer a *C. elegans* durante un periodo corto a la bacteria patógena *Pseudomonas aeruginosa*; como se mencionó anteriormente, los nematodos aprenden a evadir a esta bacteria en posteriores encuentros, pero recientemente se ha descrito que este aprendizaje es heredable por cuatro generaciones (Moore et al., 2019). De igual manera la exposición a estresores tales como infección, restricción nutrimental y estrés osmótico tienen efectos intergeneracionales en *C. elegans* (Burton et al., 2021).

Los mecanismos moleculares de herencia transgeneracional de *C. elegans* se basan en la producción y el procesamiento de RNAs pequeños. Poco después del descubrimiento del uso de dsRNA para inducir RNAs de interferencia (RNAi) en *C. elegans* por el grupo de Creig Mello (Fire et al., 1998), se observó que el silenciamiento de los genes blanco del RNAi se mantiene durante más de 20 generaciones (Vastenhow, et al., 2006). Se ha caracterizado que durante el procesamiento de RNAs pequeños tanto endógenos como exógenos, éstos se amplifican por medio de RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRPs) para posteriormente ser transportados al núcleo por proteínas argonautas (Sijen et al., 2001; Guang et al., 2008). Cuando el transporte de RNAs pequeños al núcleo ocurre en la gónada se puede dar un proceso de transgeneracionalidad, donde la proteína argonauta HRDE-1 tiene un papel muy importante. Se ha descrito que HRDE-1 está

involucrada en el procesamiento tanto de endo-siRNAs como de piRNAs. Los piRNAs son un tipo de RNAs pequeños no codificantes que se procesan por una familia de proteínas llamada Piwi. HRDE-1, en conjunto con los factores NRDE-1, 2 y 4, está relacionada con la tri-metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) (Buckley *et al.*, 2012; Buckhart *et al.*, 2011). Dicha modificación se traduce como una marca de represión transcripcional y heterocromatina. Se ha descrito que los endo-siRNAs dirigen el sitio de modificación de la cromatina por H3K9me3 y que este proceso está mediado por la vía de NRDE, y la unión de estos factores a la cromatina (Buckhart *et al.*, 2011). Nematodos mutantes de NRDE-2 y NRDE-4 presentan una disminución de H3K9me3 en sitios de unión de genes blanco de NRDE en la gónada. Esta misma disminución de esta marca represiva en genes blanco de NRDE se observó en la gónada de mutantes de HRDE-1 (Buckley *et al.*, 2012). Asimismo, la marca de H3K9me3 inducida por siRNAs en gónada se hereda a las siguientes generaciones, e incluso la marca se observa con una mayor penetrancia que en el caso de las generaciones parentales (Burton *et al.*, 2011). Debido a que la transgeneracionalidad por RNAi culmina en deposición de marcas epigenéticas, distintas proteínas escritoras de dichas marcas son esenciales para el proceso. SET-32 y SET-25 son metiltransferasas de histonas (HMTs) que se encargan de la trimetilación de la H3K9, H3K27, y H3K26 (Frolows & Ashe, 2021). Estos datos sugieren que la vía de procesamiento de RNA pequeños está involucrada en cambios epigenéticos en la gónada, los cuales pueden ser heredados transgeneracionalmente; sin embargo, aún no se conocen a detalle todos los elementos que participan en este proceso y cómo se lleva a cabo el mantenimiento y el término de silenciamientos y conductas heredables en *C. elegans*.



**Figura 4. Mecanismos moleculares de la herencia epigenética transgeneracional en *C. elegans*.** a) Mecanismos de herencia epigenética por RNAi. Los RNAs de doble cadena, exo-siRNAs, piRNAs o 26G RNAs, son cortados por DICER y transportados al mutator focus por la argonauta RDE-1, donde RISC, junto con RNA polimerasas dependientes de RNA, sintetizan RNAs secundarios que son posteriormente transportados al núcleo. Dentro del núcleo HRDE-1 en conjunto con NRDE-2, NRDE-1, NRDE-4 o NRDE-3 regulan la expresión al impedir el paso de la RNA polimerasa o reclutando proteínas escritoras de marcas post-traduccionales en las histonas como SET-32, SET-25 y MES-2. b) Mecanismos de herencia epigenética por RNAe. piRNAs son transcritos del genoma y luego son transportados por la argonauta PGR-1 a los gránulos P donde se forman el complejo de piRISC. Cuando los piRNAs son anclados por piRISC, estos pasan al mutator focus donde se sintetizan RNAs secundarios que siguen el mismo camino del sistema de la herencia epigenética por RNAi.

Si bien la gónada de *C. elegans* está involucrada en la herencia transgeneracional, es evidente que otros tejidos deben estar involucrados, sobre todo aquellos que sienten el ambiente. En este sentido se ha reportado que RNAs pequeños generados en las neuronas pueden ir a la línea germinal y causar efectos transgeneracionales (Devanapally *et al.*, 2015; Posner *et al.*, 2019). La proteína RDE-4 neuronal, la cual está involucrada en el procesamiento del RNA, genera

endo-siRNA's los cuales son posteriormente pueden ser en gónada, donde se procesan por HRDE-1 (Posner *et al.*, 2019). Es importante mencionar que la actividad de RDE-4 es necesaria para las conductas de migración poblacional y de memoria en *C. elegans* (Tonkin & Bass, 2003). En este mismo estudio se analizaron los efectos de RDE-4 sobre conductas de quimiotaxis de manera transgeneracional, encontrando que la heredabilidad de endo-siRNAs procesados por RDE-4 es capaz de rescatar conductas migratorias en mutantes de RDE-4 (Posner *et al.*, 2019). Por otra parte, se ha descrito que siRNAs de la bacteria patógena *P. aeruginosa* son internalizados por *C. elegans* vía SID-1, y participan en el aprendizaje aversivo ante éstas, y este comportamiento aprendido se transmite de manera transgeneracional mediante la vía de procesamiento de RNAs (Kaletsky *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha propuesto que alteraciones epigenéticas en el intestino inducen cambios en los estados epigenéticos en la línea germinal y que probablemente, esta comunicación es a través de un péptido que se secreta en el intestino (Nono *et al.*, 2020).

Así pues, aunque se tienen identificados varios fenómenos de herencia transgeneracional en *C. elegans* donde RNAs pequeños participan en el proceso de algunos fenotipos, no se sabe si estos están involucrados en todo tipo de transgeneracionalidad. Así mismo, no se conoce cómo los RNAs de un tejido pueden llegar a otro, ni existe claridad en cómo estos RNAs se comunican con la maquinaria epigenética para dar fenotipos heredables.

### **C. *elegans* expuesto a alta glucosa ambiental**

*C. elegans* se ha utilizado como modelo para distintas patologías humanas debido a la conservación en las vías de señalización y vías metabólicas entre nemátodos y mamíferos. Este organismo ha sido usado como modelo para estudiar los efectos de la exposición a alta glucosa y se ha determinado que al adicionar el medio de *C. elegans* con glucosa su longitud y área aumentan de manera proporcional a la concentración de glucosa (Alcantar- Fernandez *et al.*, 2019). Ya que la celularidad de los nematodos es fija, este aumento de talla probablemente se deba a un aumento en el tamaño de las células. Aunado al aumento de tamaño, los nematodos que han sido expuestos a concentraciones altas de glucosa tienen un alto contenido de glucosa interno el cual es dependiente de la concentración de glucosa ambiental a la que se les expuso (Lee *et al.*, 2009, Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019, Schlotterer *et al.*, 2009). La concentración de triglicéridos también se ve aumentada tras la exposición a glucosa (Alcantár-Fernández, *et al.*, 2019).

Otro fenotipo descrito sobre la exposición de *C. elegans* a altas concentración de glucosa es el decremento en la esperanza de vida (Shlotterer *et al.*, 2009; Ray, *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2009; Alcántar-Fernández *et al.*, 2019). Se ha sugerido que la reducción en la vida media inducida por la exposición a alta glucosa depende parcialmente de la vía de señalización tipo insulina. Cuando los nematodos son



expuestos a glucosa hay una regulación negativa de DAF-16 (Lee *et al.*, 2009; Alcántar-Fernández, *et al.*, 2019), por lo que se ha conectado los efectos de esta vía sobre la disminución en la esperanza de vida. De igual manera se ha asociado a la vía de AMPK en la disminución de la esperanza de vida, ya que nematodos mutantes de esta vía revierten el fenotipo (Riedinger *et al.*, 2018). Otros de los fenotipos observados en nematodos por la exposición a glucosa son un aumento en la apoptosis; un aumento en la expresión y en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD); y, alteraciones dosis dependiente en la morfología, masa y función mitocondrial (Choi, 2011; Alcántar-Fernández, *et al.*, 2019; Alcántar-Fernández, *et al.*, 2020). Se considera que muchos de los diversos efectos causados por la exposición a glucosa se derivan del estrés oxidativo. Se ha observado que la disminución de la esperanza de vida puede recuperarse en nematodos que sobreexpresan a la glioxalasa-1 (Riedinger *et al.*, 2018).

Por otro lado, el factor de transcripción CREB/*crh-1* se sobreexpresa bajo la exposición a alta glucosa de manera dependiente a la concentración de esta (Alcántar-Fernández, *et al.*, 2019). Por lo tanto, la adición de glucosa al medio es capaz de afectar la regulación de factores de transcripción, y a su vez de sus genes blanco, aunque no se conocen a profundidad los efectos que dichas alteraciones tiene sobre el organismo.

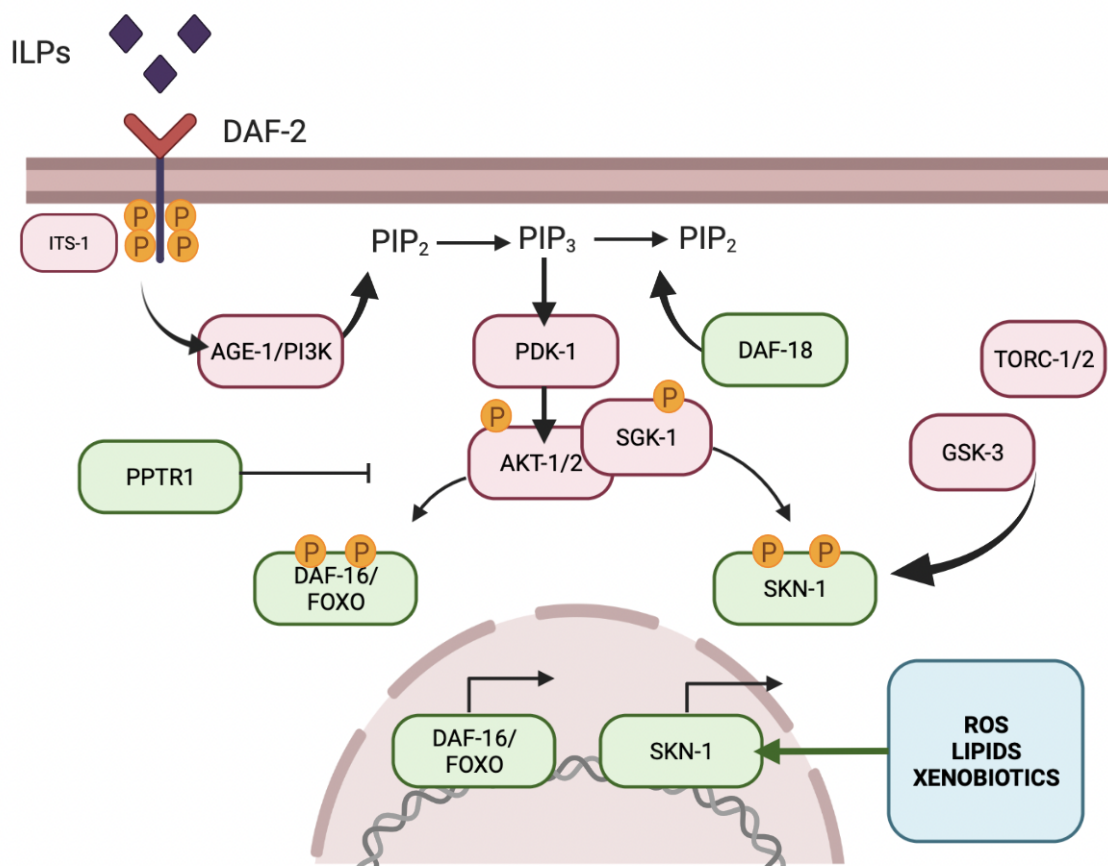
### **Vías de respuesta al ambiente conservadas en *C. elegans***

*C. elegans* se ha consolidado como un organismo modelo para el estudio de distintas patologías humanas debido a que, aunque se podría considerar como un organismo más simple, tiene un alto grado de similitudes con mamíferos. La mayoría de los genes y vías involucradas con enfermedades humanas están presentes en el nematodo, teniendo que aproximadamente el 83% del proteoma del nematodo tiene homólogos con el genoma humano (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Lai *et al.*, 2000).

### **Vía tipo insulina**

La vía de la insulina se encuentra conservada entre *C. elegans* y otros organismos como mamíferos (Fig 5). El gen *daf-2* es el único ortólogo que codifica para el receptor de insulina en el nematodo (Kimmura *et al.*, 1997). Este receptor es capaz de reconocer a una gran cantidad de péptidos tipo insulina (ILPs) (Kawano *et al.*, 2000; Pirce *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003). Se han identificado 40 posibles genes en el genoma de *C. elegans* codificantes a ILPs, de los cuales el péptido INS-1 es el que tiene mayor grado de homología con la proteína de insulina humana. En *C. elegans* la vía tipo insulina está solo parcialmente involucrada en el transporte intracelular de glucosa por medio del transportador FGTR-1, ya que mutantes de *daf-2* reducen la internalización de glucosa a las células más no la abaten por completo (Feng *et al.*, 2014; Zarse *et al.*, 2012).

En la vía de la insulina de *C. elegans* los ILPs son reconocidos por el receptor DAF-2 el cual recluta al substrato IST-1, esto resulta en la activación del ortólogo de PI3K, la proteína AGE-1 (Wolkow *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 1996). La activación de AGE-1 lleva al aumento de fosfatidilinositol (4,5)-trifosfato (PIP3) causando así que se active la cascada de cinasas de PDK-1 y AKT-1/2, lo que culmina con la fosforilación de diversos factores de transcripción impidiendo su translocación al núcleo, en particular el factor de transcripción DAF-16/FOXO (Paradis *et al.*, 1998). Como mencionado anteriormente, AGE-1 es el ortólogo de la subunidad catalítica p110 de PI3K que actúa río abajo de DAF-2 en la vía tipo insulina. Los mutantes de *age-1* son más resistentes al estrés oxidante y tienen una mayor esperanza de vida pues se asemeja al fenotipo de una restricción calórica (Ayyadevara *et al.*, 2008; Friedman & Johnson, 1988).



**Figura 5. Vía de señalización de la insulina en *C. elegans*.** En la figura se muestra la vía de señalización tipo insulina en *C. elegans*. En morado se representan los péptidos tipo insulina (ILPs) que son reconocidos por el receptor DAF-2 lo que provoca su autofosforilación. Posteriormente, DAF-2 fosforila y activa a AGE-1. AGE-1 activa mediante fosforilación a PIP2 el cual se convierte en PIP3, y que a su vez activa a PDK-1. PDK-1 fosforila a las quinasas AKT-1. AKT-1 fosforila a los factores de transcripción DAF-16 y SKN-1, evitando su relocalización al núcleo. En rojo se muestran a los reguladores

negativos de los factores de transcripción DAF-16 y SKN-1, y en verde se muestran a reguladores positivos de la vía como DAF-18 y PPTR1 (Modificada de tesis de licenciatura Zurita-León, 2022).

### **CRH-1/CREB**

El factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*) está implicado en distintos procesos celulares que van desde el desarrollo celular hasta la respuesta inmune en diversos organismos. Particularmente tanto en mamíferos como en *Drosophila* y *Aplysia*, se ha demostrado que CREB es esencial para el establecimiento de memoria a largo plazo. Este factor de transcripción se activa, al aumentar los niveles intracelulares de cAMP, a través de la fosforilación de la serina 133 de su secuencia. Entre los estímulos que dicha modificación causa que CREB se transloque al núcleo y se una al DNA específicamente en secuencias CRE (*cAMP response element*). Las secuencias CRE se encuentran en los promotores de los genes blancos de este factor transcripcional, el cual se une a través de su dominio BZIP (Alberini, 2009). Existen distintas vías que llevan a la activación de CREB. Este puede ser activado por la vía de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de cAMP (Gonzalez & Montminy, 1989). Otra de las maneras por las que CREB puede ser activado es por la entrada de  $Ca^{2+}$  la cual lleva a la activación de cinasas calcio-calmodulina dependientes (CaMK), activación que ocurre principalmente en neuronas.

En *C. elegans* *crh-1* es el gen ortólogo de CREB (Kimura *et al.*, 2002). *crh-1* se expresa principalmente en neuronas y en el intestino de manera constitutiva. Se sabe que, como en otros animales, *crh-1* regula la memoria a largo plazo debido a que mutantes en este gen tienen impedimentos en paradigmas de memoria (Kauffman *et al.*, 2010; Nishida *et al.*, 2011) y se ha observado que su actividad es esencial durante el entrenamiento de los gusanos en el proceso de memoria asociativa (Dahiya *et al.* 2019). CRH-1 controla la expresión del gen *tph-1* el cual es necesario para la síntesis de serotonina (Zubenko *et al.*, 2009). Otra de las funciones que ejerce *crh-1* en *C. elegans* es la regulación de la esperanza de vida ya que mutantes nulas de *crh-1* presentan un decremento en su esperanza de vida en comparación con la cepa silvestre (Mair *et al.*, 2011).

### **Vía de SKN-1/NRF**

Otra de las vías de respuesta al ambiente conservadas en *C. elegans* es la vía de SKN-1. *skn-1* es el único ortólogo de la familia de factores transcripcionales Nrf en *C. elegans* (Walker *et al.*, 2000; An, 2003). Al igual que sus ortólogos, SKN-1 responde a estrés por especies reactivas de oxígeno, estrés proveniente del retículo, aumento de lípidos y xenobióticos. Ante dichos estímulos SKN-1 activa respuestas de estrés, detoxificación y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (An *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009; Glover *et al.*, 2013). Aun en ausencia de estrés, SKN-1 tiene distintos papeles como regulador de genes involucrados en

respuesta antimicrobiana, en proteostasis y metabolismo de lípidos. Como mencionado anteriormente, recientemente se ha puesto particular interés en el papel de SKN-1 sobre la regulación del metabolismo lipídico. En situaciones de ayuno se ha observado que SKN-1 causa la sobreexpresión de genes del metabolismo de lípidos y promueve la movilización de lípidos (Paek *et al.*, 2012; Steinbaugh *et al.*, 2015) y de hecho, animales mutantes de *skn-1* presentan un aumento en la acumulación de lípidos (Steinbaugh *et al.*, 2015). Particularmente al exponer nematodos a medio alto en glucosa y a *S. typhimurium* presentan una disminución en la actividad de SKN-1 como factor transcripcional (Li *et al.*, 2018).

La proteína SKN-1 tiene diversas isoformas las cuales se expresan de manera dependiente del tejido. Por medio de microscopía se ha observado que la isoforma SKN-1b se expresa de manera prominente en el sistema nervioso y en particular en las neuronas quimiosensores ASI (Blackwell *et al.*, 2015). Se conoce que SKN-1b en esta neurona participa en la respuesta endocrina causante del aumento de la esperanza de vida en nematodos expuestos a restricciones calóricas y que está involucrado en controlar la saciedad de estos (Tartidas-Pallas *et al.*, 2021).

### Vía de HIF-1

El factor de transcripción *hif-1* es el único ortólogo de los factores de respuesta a hipoxia (HIF) en *C. elegans* (Jiang *et al.*, 2001). HIF-1 está implicado en la respuesta a distintos tipos de estrés como estrés oxidativo, estrés por calor e inflamación, al igual que en envejecimiento (Zhang *et al.*, 2009; Yeo *et al.*, 2019). Se sabe que en condiciones de hipoxia, HIF-1 es responsable de regular el cambio de un metabolismo respiratorio a un metabolismo glicolítico. En mamíferos durante normoglucemia, HIF-1 alpha (HIF1a) es modificado postraduccionalmente por EGL-9 lo cual aumenta su afinidad a la proteína VHL causando así que HIF-1a sea degradado por el proteosoma. Cuando hay condiciones de hipoxia, HIF-1a no sufre modificaciones por EGL-9 permitiendo que se una con HIF-1B permitiendo su función como factor de transcripción (Ke & Costa, 2006).

En condiciones de hiperglucemia las células se encuentran en una situación de pseudo-hipoxia, ya que hay un incremento en la proporción de NADH/NAD<sup>+</sup> (Williamson *et al.*, 1993; Gleissner *et al.*, 2007). En cultivos celulares se ha observado que tratamientos de hipoxia con elevadas concentraciones de azúcar causan un aumento en la degradación de HIF-1a. En condiciones de hiperglucemia hay un aumento en el contenido de 2-methylglyoxal, el cual inhibe la formación del complejo de HIF-1a y HIF-1b, por lo que incrementa su degradación. Estos datos indican que ante condiciones de hiperglucemia se afecta la habilidad de responder correctamente a la hipoxia (Catrina *et al.*, 2004; Cherichova *et al.*, 2018).

En *C. elegans* la mutación de HIF-1 produce organismos aparentemente silvestres en condiciones normales, sin embargo son sensibles a estrés por hipoxia (Jiang *et al.*, 2010). Se ha observado que tanto la sobreexpresión como la pérdida de *hif-1*

causan un aumento en la esperanza de vida de los nematodos y en su resistencia ante estrés por calor (Zhang *et al.*, 2009). Se sabe que en el caso de la sobreexpresión de *hif-1*, el aumento de la esperanza de vida está mediado por la acción de DAF-16 y SKN-1; en el caso de los mutantes de este gen, el fenotipo es independiente de DAF-16 y SKN-1 (Zhang *et al.*, 2009). Por otra parte se ha observado que HIF-1 está involucrado con la adaptación a H<sub>2</sub>S, estrés mitocondrial, respuesta a ROS (Hwang *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011; Kamal *et al.*, 2016).

### **Regulación por modificaciones post-traduccionales de las histonas**

La regulación de la expresión genética en parte está influenciada por las modificaciones post-traduccionales que ocurren principalmente en las porciones amino-terminales de las histonas (Kouzarides, 2007). A groso modo, las modificaciones químicas en histonas pueden ser represivas, es decir que están relacionadas con un estado inactivo de la transcripción; o activadoras, asociadas con un estado permisible a la transcripción. Existen diversas clases de modificaciones post-traduccionales en las histonas dependiendo del residuo que es colocado; sin embargo, las más prevalentes y estudiadas son la acetilación y la metilación. Existe una compleja maquinaria de modificadores epigenéticos capaces de colocar las marcas, conocidas como escritores o *writers*; proteínas que leen las modificaciones químicas conocidos como lectores o *readers*; y proteínas que se encargan de remover o borrar, (*erasers*) dichas marcas. El dinamismo en las modificaciones post-traduccionales de las histonas confiere una enorme adaptabilidad a la regulación de la expresión genética.

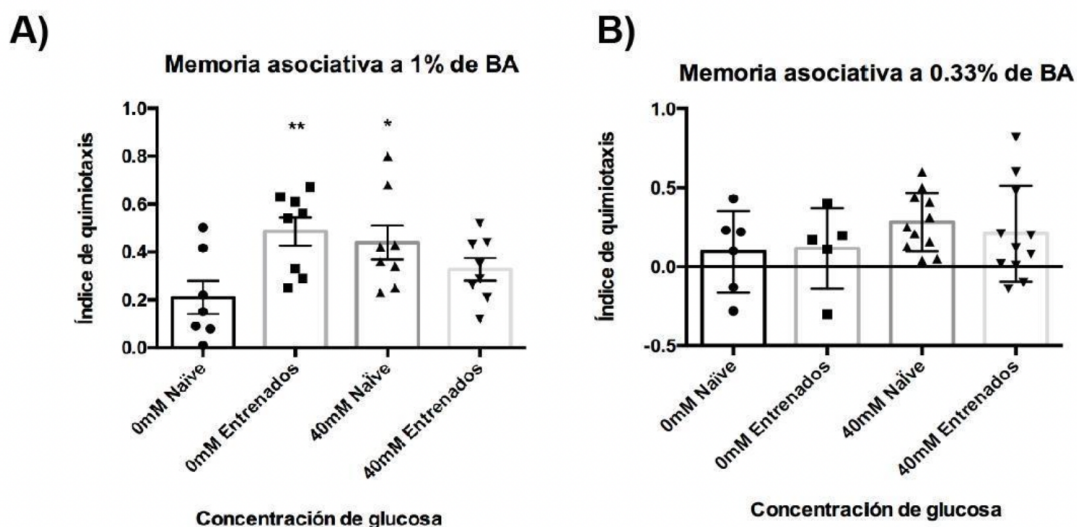
La mono-, di- y tri-metilación de la lisina K4 de la histona H3 está asociada con genes transcripcionalmente activos. En el caso de la mono-metilación, esta marca está asociada a elementos *enhancers* (Heitzman *et al.*, 2007). La di-metilación de la lisina K4 de la histona H3 (H3K4me<sub>2</sub>) está asociada con un estado de memoria transcripcional; es decir que, es una marca que se encuentra en genes que han estado previamente activos y que permite su fácil transcripción (D'Urso & Brickner, 2017). De igual manera, la tri-metilación de la lisina K4 de la histona H3 se asocia con promotores activos y correlaciona con los niveles de transcripción (Barski *et al.*, 2007).

En el nematodo *C. elegans* tiene una alta homología en las modificaciones post-traduccionales de histonas, al igual que de las proteínas encargadas de su deposición, lectura y borrado. En *C. elegans* se han descrito distintas metiltransferasas de la H3K4, incluyendo la proteína SET-30 quién media la deposición de H3K4me<sub>1</sub> y H3K4me<sub>2</sub> (Greer *et al.*, 2014). Otras metiltransferasas de histonas en *C. elegans* son SET-32, SET-25 y MES-2/EZH2. Se conoce que SET-32 deposita la trimetilación de lisina 24 de la histona H3 (H3K24me<sub>3</sub>), la cual está asociada con la transgeneracionalidad de RNAi nucleares. En el caso de SET-25 y MES-2, estas metilasas son las responsables de metilar a la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) (Towbin *et al.*, 2012). Mutantes de SET-25 y MES-2 resultan en la

pérdida de la unión perinuclear de los cromosoma; sin embargo, son viables excepto bajo crecimiento en altas temperaturas ya que hay una acumulación de elementos repetidos la cual resulta en esterilidad de los nemátodos (Towbin *et al.*, 2012; Zeller *et al.*, 2016). Tanto SET-25, MES-2, SET-32 y SET-30 están involucrados en fenómenos de herencia epigenética transgeneracional, como mencionado anteriormente (Woodhouse *et al.*, 2018; Schwartz-Orbach *et al.*, 2020).

## Antecedentes directos

Con base en los datos previamente publicados (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019) se montó un modelo de exposición a 40 mM de glucosa en el laboratorio. Para analizar los efectos que dicha exposición tenía sobre el sistema nervioso y la conducta usamos el paradigma de memoria asociativa al benzaldehído (Remy & Hobert, 2005). En este ensayo se analiza la atracción de los nematodos a benzaldehído en condiciones basales (naïve) y en nematodos que previamente fueron expuestos a este odorante en presencia de comida. Consistente con el modelo, los nematodos expuestos a 0 mM de glucosa presentan un aumento a la quimiotaxis basal tras recibir el tratamiento (Fig 6A); sin embargo, observamos que la exposición a 40 mM a glucosa causa un aumento en el gusto basal por el benzaldehído e impide el aumento por este odorante en los nematodos entrenados. Debido a que el efecto observado sobre los nematodos entrenados crecidos en glucosa causa puede deberse a una saturación de los receptores, se utilizó una concentración menor de benzaldehído (Fig 6B). Aun cuando no podemos observar un entrenamiento en los nematodos crecidos a 0 mM de glucosa, existe un aumento marginal en la quimiotaxis basal de los nematodos expuestos a 40 mM de glucosa. Estos resultados demostraron que un medio ambiente rico en glucosa, no solo afecta la conducta de los nematodos, sino que imposibilita el establecimiento de una memoria asociativa a largo plazo.



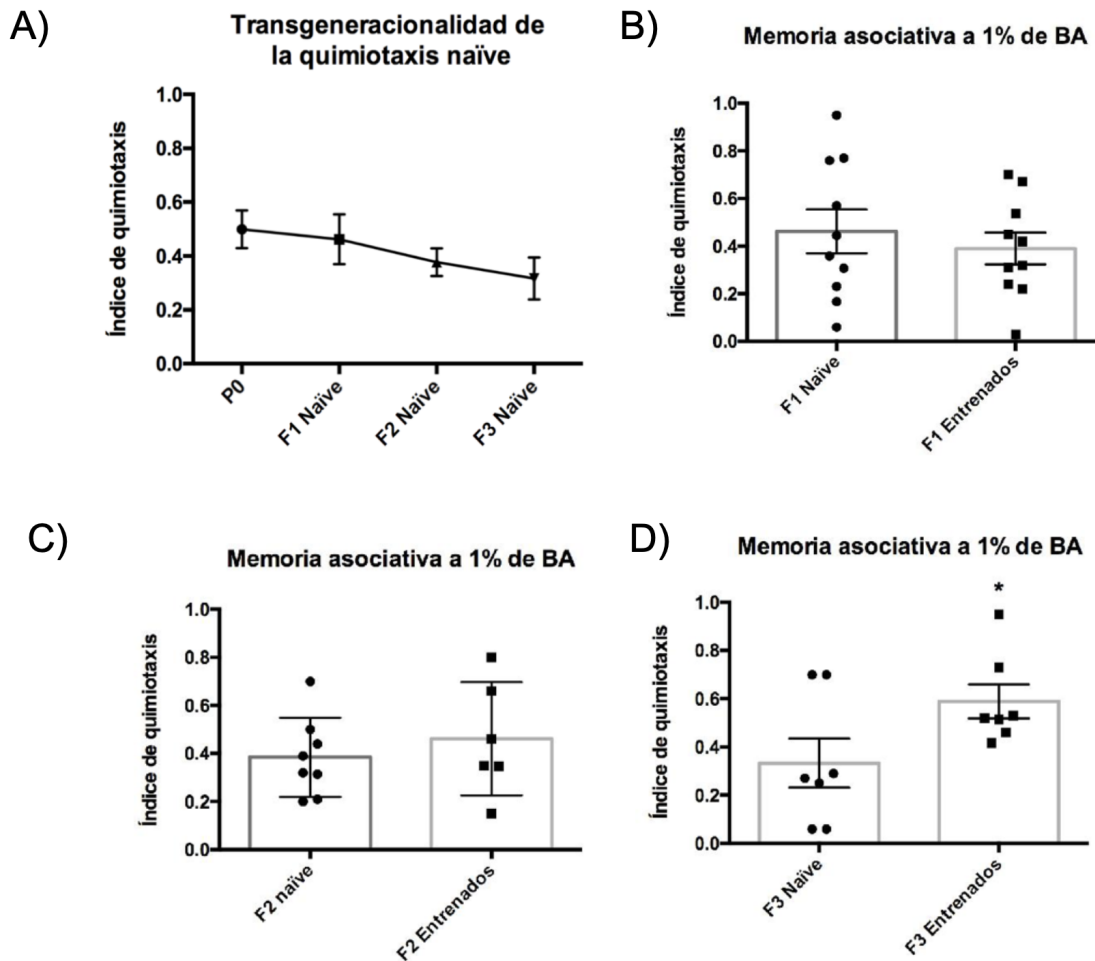
**Figura 6. La exposición a glucosa causa un aumento en la quimiotaxis basal e impide la memoria asociativa en *C. elegans*.** Se evaluó la memoria asociativa entre comida y el odorante benzaldehído en nematodos silvestres N2 crecidos en condiciones control o con 40 mM de glucosa añadida al medio NGM. En A) se ensayó una concentración de 1% de benzaldehído donde se observa que 40 mM de glucosa induce un aumento en la quimiotaxis basal al mismo tiempo que inhibe el establecimiento de una memoria asociativa.

En B) se ensayó una concentración de 0.3 % de benzaldehído la cual no es suficiente para inducir memoria asociativa, pero aún se observa un aumento marginal en la quimiotaxis basal en presencia glucosa. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (nematodos naïve crecidos en 0mM de glucosa) se indican como sigue: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Cada punto representa un experimento independiente con por lo menos 300 individuos analizados.

Posteriormente, determinamos que el aumento en la quimiotaxis basal está parcialmente regulado por la vía de la insulina ya que mutantes en DAF-2 y del factor transcripcional DAF-16/FOXO, no presentan el aumento en la quimiotaxis basal al ser expuestos a glucosa; sin embargo, estos nematodos no presentan memoria asociativa al benzaldehído cuando fueron expuestos a glucosa. Estos datos demostraron que la vía tipo insulina participa en los cambios conductuales derivados de la exposición a glucosa.

Finalmente quisimos analizar si una sola exposición a glucosa causa efectos en las generaciones subsecuentes. Para esto, se realizó un ensayo de memoria asociativa al benzaldehído en tres generaciones posteriores (F1-F2) a la exposición a glucosa (P0). Se determinó que el aumento en la quimiotaxis basal persiste en la primera generación y decrementa de manera subsecuente en las posteriores generaciones hasta normalizarse en la F3 (Fig 7). Por otra parte, la memoria asociativa al benzaldehído no está presente en la F1 pero se recupera a niveles normales en la F3. Con base en estos datos, se concluyó que la exposición a glucosa durante una generación tiene como consecuencia un fenotipo intergeneracional en la quimiotaxis al benzaldehído y su memoria asociativa.





**Figura 7. Efectos intergeneracionales sobre la memoria asociativa en *C. elegans* ante la exposición a glucosa.** **A)** Nematodos silvestres de la cepa N2 fueron expuestos a 40 mM de glucosa (P0) y la quimiotaxis basal a 1% de benzaldehído de las tres generaciones subsecuentes (F1-F3) fue evaluada. En **B)** se muestra el índice de quimiotaxis de la primera generación (F1) de la P0 expuesta a glucosa. Se observó que nemátodos naïve tienen un aumento en la quimiotaxis comparado con el de la P0 y que los nemátodos entrenados por imprinting con BA 1% no presentan memoria asociativa. **C)** En la segunda generación (F2) se observa que los nemátodos entrenados tampoco presentan memoria asociativa al BA 1%. **D)** Se observa que en la tercera generación (F3) hay un decremento en la quimiotaxis al benzaldehído de los nemátodos naïve. En el caso de los nemátodos entrenados estos ya presentan un aumento en el índice de quimiotaxis, indicando memoria asociativa al benzaldehído. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media ± SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (nematodos naïve crecidos en 0mM de glucosa) se indican como sigue: \*p<0.05

Debido a que la exposición durante una generación tiene únicamente efectos de manera intrageneracional, nos preguntamos si la exposición crónica durante varias generaciones causa efectos transgeneracionales. Por otro lado, existen otras vías que puedan estar involucradas en los cambios conductuales y el impedimento de la

memoria asociativa al benzaldehído. Debido a esto es importante analizar con mayor detalle el fenotipo de mutantes de genes de interés.

## **Pregunta de investigación**

Debido a que la exposición aguda a glucosa causa cambios conductuales, ¿qué vías están involucradas en dichos cambios? Por otra parte, ¿la exposición crónica a glucosa tiene efectos transgeneracionales sobre la conducta? Del ser este el caso ¿cuáles son los cambios transcripcionales causados en la exposición aguda y crónica a glucosa y estos se mantienen de manera transgeneracional?

## **Hipótesis**

La exposición aguda y crónica a glucosa causa cambios transcripcionales en vías metabólicas y de respuesta a estrés, las cuales se ven reflejadas en cambios conductuales de manera transgeneracional en *C. elegans*.

## **Objetivo**

Analizar los cambios transcripcionales y conductuales en *C. elegans* inducidos por la exposición aguda o crónica a glucosa y sus efectos transgeneracionales.

### **Objetivos particulares**

1. Analizar qué vías metabólicas y de respuesta a estrés se afectan por la exposición a 40 mM de glucosa en animales mutantes y corroborar su involucramiento sobre la quimiotaxis al benzaldehído.
2. Establecer un modelo de exposición crónica, es decir por cinco generaciones (F5), a glucosa, para evaluar los efectos transgeneracionales cinco generaciones posteriores a dicha exposición (F10).
3. Determinar el efecto que tiene la exposición ambiental a glucosa durante cinco generaciones de *C. elegans* sobre la quimiotaxis al benzaldehído, y otros odorantes, en comparación con animales expuestos a glucosa sólo durante una generación.
4. Analizar los efectos transgeneracionales de la exposición a glucosa durante cinco generaciones sobre el tamaño de los nemátodos y la cantidad de DNA mitocondrial.

5. Determinar por medio de RNA-seq que genes se encuentran diferencialmente expresados en *C. elegans* cuando se expone a 40 mM de glucosa por una o varias generaciones, y sus efectos transgeneracionales.

## Métodos

### Mantenimiento de cepas

Para manipular a los nemátodos se utiliza la solución amortiguadora M9 la cual contiene 6 g de  $\text{NaHPO}_4$ , 3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g de  $\text{NaCl}$  y 0.25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  disuelto en 1L de agua. La solución se esteriliza en autoclave por 20 min a  $120^\circ\text{C}$ . Las cepas se mantuvieron en placas de NGM-Complete (17 g Bacto Agar, 2.5g Bacto Peptona, 3 g  $\text{NaCl}$  adicionado con 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  1M, 1 mL de colesterol 5mg/mL, 1 mL de  $\text{MgSO}_4$  1M y 25 mL de buffer  $\text{KPO}_4$  pH 6) plaqueada con un tapete de bacterias *E. coli*, cepa OP50-1 crecida *over-night* en LB a  $37^\circ\text{C}$ , como alimento. En el caso de los ensayos con bacteria muerta, la bacteria OP50-1 se esterilizó en autoclave antes de plaquearla en las cajas de NGM-complete.

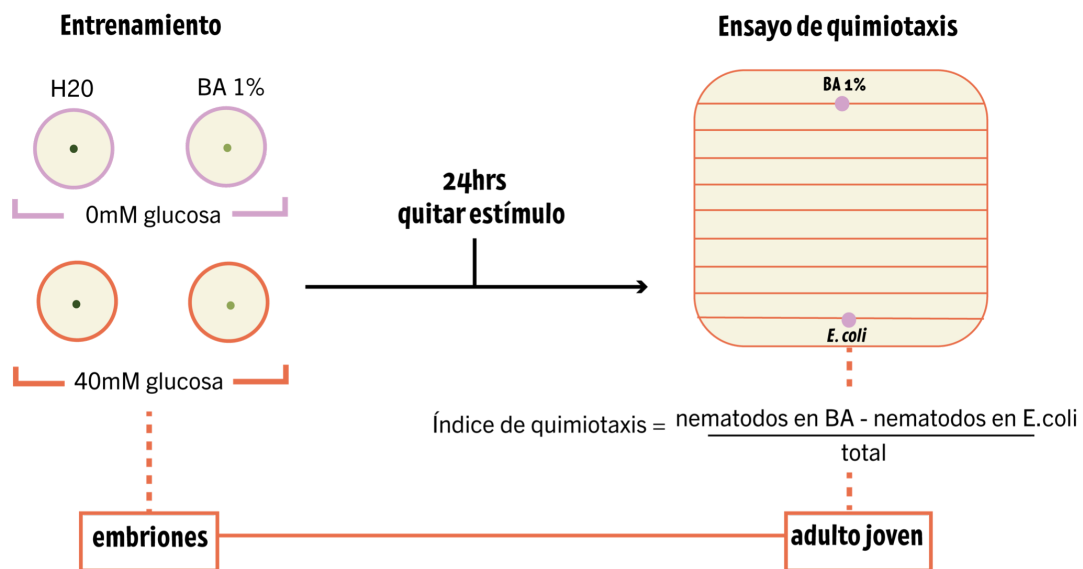
Para sincronizar los cultivos de *C. elegans*, los hermafroditas en estadio de adulto joven se recuperaron en 1 mL de buffer M9 y posteriormente se añadió 1300  $\mu\text{L}$  de cloro comercial y 650  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaOH}$  mM. La suspensión se puso en agitación por vórtex por 3 min, y se centrifugó a 1000 rpm durante un minuto. Se hicieron cinco lavados con buffer M9 y se transfirieron los embriones a placas de medio NGM Complete. En el caso de los ensayos de tamaño posterior a los lavados con buffer M9 se dejaron eclosionar los embriones durante 16 horas. Se recolectaron larvas L1, y se transfirieron a placas de medio NGM Complete.

### Ensayos de quimiotaxis a benzaldehído

Se colocaron aproximadamente 40 nematodos adultos en una caja Petri de 60 mm de NGM con 0 mM de glucosa o con 40 mM de glucosa, según se indique. Se dejó que los nematodos ovipositan durante 4 horas y se removieron los nematodos adultos por medio de lavados con la solución M9 pero dejando los embriones en las cajas, ya que estos se quedan en el tapete de bacteria. Una vez removidos los adultos se colocaron en la tapa 2  $\mu\text{L}$  de benzaldehído (BA) al 1% disuelto en agua estéril, a menos que se indique otra concentración, para las condiciones de entrenamiento previamente establecidas en el laboratorio. Para la condición control se colocó agua estéril. 24 horas después se removió el estímulo cambiando la tapa de la caja. Se esperó 48 horas hasta que los nematodos se encontrarán en el primer día de adultez para poder realizar el ensayo de quimioatracción.

Para el ensayo de quimioatracción se colectaron nematodos del mismo estadio con M9 y se colocaron en una placa de quimiotaxis. Las placas de quimiotaxis consisten en una caja Petri cuadrada de 180 mm x 180 mm que contiene medio NGM sólido. Esta caja se dividió en 10 filas (Fig 8). En un extremo de la placa se colocó 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaN}_3$  y 2  $\mu\text{L}$  de BA 1%, a menos que se indique otra concentración. En el otro extremo se colocó 2 $\mu\text{L}$  de  $\text{NaN}_3$  y 2 $\mu\text{L}$  de OP50-1. Posteriormente se colocaron en el centro de la caja aproximadamente X número de gusanos adultos. Una vez que los nematodos han migrado, se cuantificó el número de gusanos en cada fila. Se

contaron utilizando un microscopio estereoscópico. Se calculó el índice de quimioatracción usando la siguiente fórmula: (# nematodos en BA - # nematodos en *E. coli*)/total de nematodos, donde el número de nematodos en cada condición consiste en el número de nematodos las primeras tres filas.



**Figura 8. Ensayo de memoria asociativa a benzaldehído.** Para los ensayos de memoria asociativa a benzaldehído se obtienen embriones tanto en cajas con 0 mM y 40 mM de glucosa, a las cuales se les coloca un estímulo de H<sub>2</sub>O o benzaldehído en la tapa. Después de 24 horas se remueve el estímulo y se esperan 48 horas más hasta que el nemátodo llegue a la etapa de adulto joven para realizar el ensayo de quimiotaxis. En este ensayo se utilizan placas cuadradas divididas en 10 filas. Se coloca en la última fila de cada extremo NaN<sub>3</sub> al igual que BA o *E. coli* respectivamente. Una vez colocados los odorantes se colocan aproximadamente 300 nemátodos en el centro de la caja y se dejan migrar. Finalmente los nemátodos se cuantifican para obtener el índice de quimiotaxis.

### Ensayos de exposición crónica a glucosa para transgeneracionalidad

Para los ensayos de transgeneracionalidad se expusieron los nematodos a 40 mM de glucosa durante cinco generaciones (i.e. F<sub>5</sub>). Para la exposición a glucosa se añadió 40 mM de glucosa estéril al medio NGM COMPLETE estéril, con el cual se formaron placas en cajas Petri de 6 cm para el mantenimiento y los protocolos de entrenamiento a benzaldehído 1%. Se analizó la memoria asociativa por *imprinting* y la quimiotaxis basal en estos nematodos. Posterior a la quinta generación expuesta a glucosa, los nematodos se mantuvieron durante cinco generaciones más en

condiciones control (i.e F10). En las condiciones control se utilizaron placas hechas en cajas Petri de 6 cm con NGM COMPLETE. En ambos tratamientos, 0 mM de glucosa tanto como en 40 mM de glucosa, se sembró un tapete de *E. coli* crecida en medio Luria-Bertani (LB) Lennox (Sigma-Aldrich) con una densidad óptica de 0.34 a 0.40 ODs medida a 600 nm.

#### MODELO DE EXPOSICIÓN CRÓNICA A GLUCOSA



Figura 9. Diseño experimental del modelo de exposición crónica a glucosa.

#### Ensayos de quimiotaxis a butanona

Para analizar la quimiotaxis a butanona se colectan los nemátodos en 1 mL de buffer M9. Posteriormente se retira el sobrenadante y se colocan los nematodos en placas redondas p100 con NGM-Complete. Dichas placas previamente fueron marcadas como en la figura siguiente y en cada punto se coloca 1 $\mu$ L de NaN<sub>3</sub>. En uno de los puntos se coloca 1 $\mu$ L de 2-butanona al 0.1% y del otro lado se coloca 1 $\mu$ L de EtOH 96% como control. El índice de quimiotaxis se calcula: #nematodos en butanona- # de nematodos en el etanol / Total.

#### Cuantificación de mtDNA

Para la cuantificación de mtDNA extrajo DNA de cada una de las condiciones por triplicado. Se colectaron aproximadamente 40 nematodos en el estadio L4 en buffer de lisis (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20, 0.01% gelatina y proteinasa k (200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). El lisado de gusanos se incubó a 60°C por una hora y 95°C por 15 minutos. Se tomó 1 $\mu$ L de lisado como templado para realizar una qPCR utilizando el SYBR Green Real-Time qPCR Master Mix. Se utilizaron primers para nudo-1, como gen mitocondrial, y para ges-1, como gen nuclear.

Para calcular el cambio entre mtDNA/nDNA como descrito por Quiros et al. (2017). En este se utilizó el método de  $\Delta\Delta$ Ct, donde el  $\Delta$ Ct se calculó como la resta entre los Cts de nudo-1 menos ges-1 de la misma condición. Para el  $\Delta\Delta$ Ct se restó el  $\Delta$ Ct de la condición P0 menos la condición experimental, y finalmente se elevó 2 <sup>$\Delta\Delta$ Ct</sup>.

#### Cuantificación del tamaño de los nemátodos

Para la cuantificación del tamaño de los nemátodos crecidos con glucosa se realizó una sincronización de nemátodos hermafroditas como previamente descrito. Los embriones obtenidos se colocaron en medio M9 y se permitió estos eclosionaran. Una vez en el estadio L1, las larvas se recolectaron y se transfirieron a placas de

medio sólido NGM-Complete con un tapete de *E. coli*, adicionadas con 0 mM glucosa o con 40 mM glucosa. Se permitió que los nematodos llegaran al estadio de adulto de un día, donde estos fueron recolectados y preparados para observar en microscopio. Para la preparación de microscopio los nemátodos se colocaron en un pad de agarosa al 2% y se inmovilizaron con NaN<sub>3</sub> 10mM. Se tomaron fotos de las muestras bajo un aumento de 100x usando un microscopio Axio Zoom v16 de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Posteriormente se analizaron las muestras con el software ImageJ. Para medir la longitud de los gusanos se hizo una medición longitudinal desde la punta de la cabeza hasta el final de la cola.

### **Análisis en microscopía confocal**

Para los análisis en microscopía confocal de la actividad de CREB se usó la cruce de la cepa pCRE::GFP y la cepa OH10690 (otIs356 [*rab-3p*(prom1)::2xNLS::TagRFP]), por lo que se expresa GFP en un promotor CRE, indicando actividad de CRH-1, y RFP en neuronas. Los nemátodos se crecieron en 0 mM y 40mM de glucosa. Para la preparación en microscopio los nemátodos se colocaron en un *pad* de agarosa al 2% y se inmovilizaron con NaN<sub>3</sub> 10 mM. Se tomaron fotos de las muestras en el microscopio confocal Zeiss LSM 800 de la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

### **Construcción de librerías para RNAseq**

Para la construcción de librerías se aisló RNA de las generaciones P0, F1, F5 y F10, por triplicado. La extracción se realizó con el kit de Qiagen RNeasy plus micro kit (Cat. No. / ID: 74034.) Para la extracción de RNA se recolectaron nematodos en estadio de adulto joven con buffer M9. Se realizó un lavado y se removió el sobrenadante. Posteriormente se les agregaron 350 µL de buffer RLT adicionado con beta-mercaptoetanol 10%. Las muestras se pulverizaron con nitrógeno líquido en mortero. La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del kit de Qiagen. La integridad del RNA se analizó por BioAnalyzer. Para la construcción de librerías se utilizó el kit de Illumina Stranded mRNA Prep. Se cuantificó la concentración por medio de Qubit y se analizó el tamaño de las librerías por BioAnalyzer. La secuenciación se llevó a cabo en un equipo NextSeq en un formato *pair-end* 150x2 en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

### **Análisis de RNAseq**

El análisis inicial de los datos fue realizado por el M. en C. Martí Wilson Verdugo. Posteriormente la ontología de genes se utilizó el programa de Gene Ontology (Ashburner et al., 2000) utilizando los genes con un pajustado menor a 0.05 y un fold enrichment menor a -2 y mayor a 2. El resto de las gráficas se realizaron usando Rstudio (2022.12.0+353).

## **Estadística**

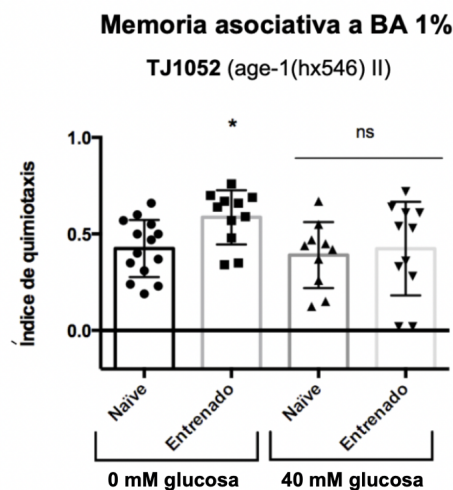
Los datos fueron analizados y gráficos usando el programa Prism 9 (Version 9.3.2 (350)). Las pruebas estadísticas utilizadas fueron ANOVA seguido de la prueba post-hoc de Tukey.



## Resultados

### La exposición a glucosa induce cambios conductuales a través de la vía tipo insulina y el factor inducible por hipoxia HIF-1

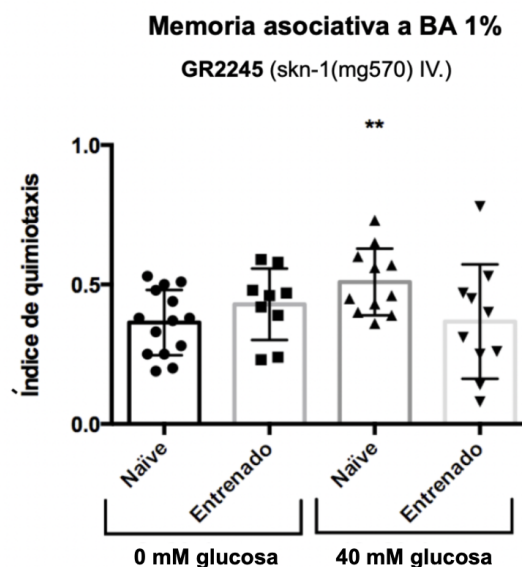
Para continuar con el análisis del papel de la vía tipo de la insulina en el cambio conductual inducido por glucosa *C. elegans*, nos preguntamos cuál era el efecto de la exposición a glucosa en la quimiotaxis y memoria asociativa al benzaldehído de mutantes en AGE-1 (el homólogo de PI3K en mamíferos). Utilizamos la cepa mutante para este gen TJ1052 (*age-1(hx546)* II.) (Ayyadevara *et al.*, 2008) para realizar ensayos de memoria asociativa a 1% de benzaldehído, tanto en condiciones control de 0 mM de glucosa o en condiciones de 40 mM de glucosa (Fig 10). Nuestros resultados muestran que los nematodos mutantes en *age-1*, expuestos a 40 mM de glucosa, presentan una quimiotaxis basal similar a la de los nematodos crecidos en condiciones control (Fig 10); es decir que se recupera el fenotipo sobre la quimiotaxis basal. En el caso de los nematodos expuestos a 40 mM de glucosa a los cuales se les realizó el entrenamiento a memoria asociativa, no se observó un aumento de la quimiotaxis comparado con los nematodos naïve de esta misma condición. Estos datos indican que AGE-1 está involucrado en el cambio conductual en la quimiotaxis basal a benzaldehído inducido por la exposición a glucosa, mas no en los efectos de la glucosa sobre la memoria asociativa.



**Figura 10. AGE-1 está involucrado en el cambio conductual de la quimiotaxis basal al benzaldehído.** Nematodos de la cepa TJ1052 (*age-1(hx546)* II) fueron expuestos a 40 mM de glucosa desde la ovoposición hasta la etapa de adultos jóvenes. Mediante ensayos de quimiotaxis se evaluó la preferencia basal a benzaldehído (BA) y la quimiotaxis posterior a un entrenamiento asociativo entre el odorante y la comida. Los nematodos crecidos en 0 mM de glucosa presentan un aumento en la quimiotaxis al ser entrenados, lo cual indica la formación de una memoria asociativa mientras que los

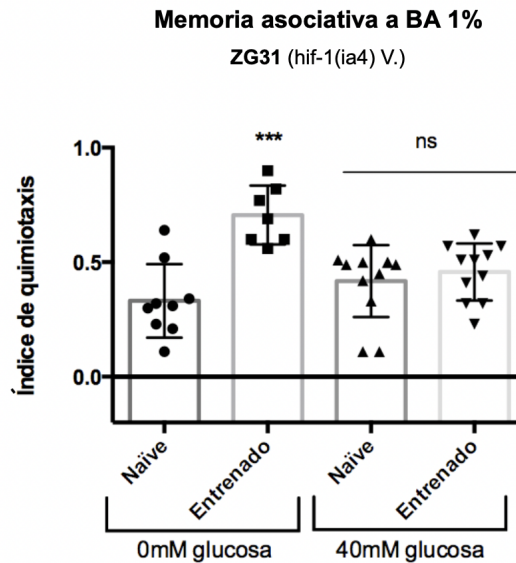
animales crecidos a 40 mM de glucosa, tanto naïve como entrenados, no tienen diferencias significativas con respecto a los nematodos naïve no expuestos a glucosa. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (naïve + 0 mM glucosa) se indican como sigue: \* $p < 0.05$ . Cada punto representa un ensayo con aproximadamente 300 gusanos evaluados.

La exposición a alta glucosa puede desencadenar procesos que resulten en un estrés a nivel celular que repercuten en todo el organismo. Como se mencionó anteriormente, el factor transcripcional SKN-1 (ortólogo de factor antioxidante NRF2) es vital para la respuesta de *C. elegans* a distintos estresores ambientales tales como estrés oxidativo y nutricional. Con base en esto nos preguntamos si SKN-1 está involucrado en el fenotipo observado sobre la memoria asociativa al benzaldehído en presencia de glucosa. Para determinar esto, se utilizó a la cepa carente de SKN-1 GR2245 (*skn-1(mg570)* IV) expuesta a 0 mM de glucosa y 40 mM de glucosa para analizar su memoria asociativa a benzaldehído (Fig 11). Los nematodos expuestos a 0 mM de glucosa no presentan un aumento en la quimiotaxis al ser entrenados, lo cual indicaría que SKN-1 es necesaria para la formación de la memoria asociativa, sin embargo, consideramos necesario hacer más análisis para confirmar esta observación. Nuestros resultados mostraron que los nematodos mutantes en SKN-1 expuestos a 40 mM de glucosa muestran una quimiotaxis basal elevada comparada con aquellos crecidos en 0 mM de glucosa. Estos datos indican que la vía de SKN-1 no está participando sobre los cambios conductuales inducidos por la exposición a alta glucosa ambiental en *C. elegans*. Sin embargo, debido a que no se observó una memoria asociativa en los nematodos crecidos en 0 mM de glucosa no podemos concluir sobre la participación de SKN-1 sobre los defectos en la memoria causados por la glucosa.



**Figura 11. SKN-1 no participa sobre los efectos de la exposición a glucosa sobre la conducta basal a benzaldehído.** Nematodos mutantes de SKN-1 (GR2245 (*skn-1(mg570)* IV) fueron expuestos a 40 mM de glucosa desde la ovoposición hasta adultos jóvenes (72h) y la quimiotaxis fue ensayada en condiciones basales (naïve) o en un protocolo de memoria asociativa entre el odorante y comida (entrenado). Los nematodos crecidos en 0 mM de glucosa no presentan un aumento en la quimiotaxis tras realizarles el protocolo de entrenamiento. Se observó un aumento significativo en la quimiotaxis basal (naïve) de animales expuestos a 40 mM de glucosa pero no se observó un aumento del índice de quimiotaxis en los nematodos entrenados. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (naïve + 0 mM glucosa) se indican como sigue: \*\* $p < 0.01$   $n=10$  donde cada punto es un experimento independiente con aproximadamente 300 individuos.

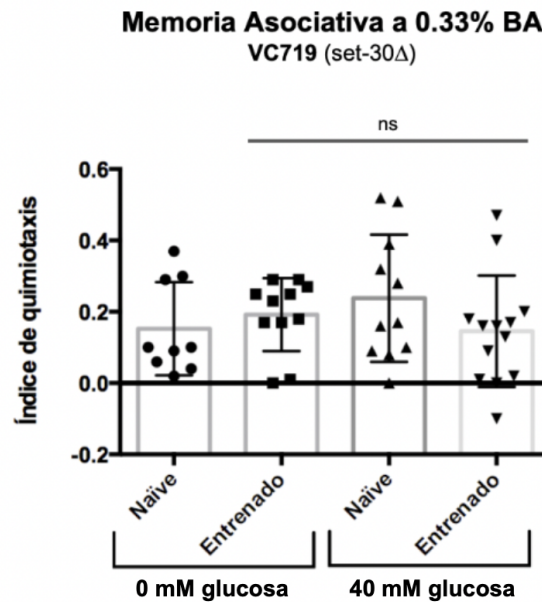
Por otro lado, el factor inducido por hipoxia HIF-1 es un factor de transcripción que media distintos procesos celulares en animales incluidos distintos tipos de estrés. Se ha observado que nemátodos expuestos a glucosa tienen un aumento en la expresión de HIF-1. Con base en estas evidencias, y el papel que ejerce HIF-1 durante la respuesta a estrés decidimos utilizar a la mutante carente de HIF-1 en *C. elegans* (ZG31 (*hif-1(ia4)* V.) para determinar el papel de esta vía en el cambio conductual inducido por glucosa. Nuestros datos mostraron que los nematodos mutantes a *hif-1* no presentan un aumento en la quimiotaxis naïve cuando son expuestos a 40 mM de glucosa (Fig. 12). Por otra parte, los nematodos expuestos a glucosa, a los cuales se les realizó el entrenamiento con BA 1%, no presentaron un aumento en la quimiotaxis comparado con las condiciones naïve. Es decir que los nematodos crecidos en 40 mM de glucosa no presentan aprendizaje. Estos datos sugieren que la vía de HIF-1 está involucrada en el aumento de la quimiotaxis basal a BA 1%, mas no en la pérdida de la memoria asociativa a este odorante causado por la exposición a glucosa.



**Figura 12. HIF-1 participa sobre los cambios de la conducta basal al benzaldehído causados por la exposición a glucosa.** Nemátodos mutantes en HIF-1 (ZG31(*hif-1(ia49)* V.) fueron expuestos a 40 mM de glucosa durante y su quimiotaxis al benzaldehído fue analizada en condiciones basales (naïve) o en un protocolo de memoria asociativa con el odorante y comida. Se observó que los nemátodos naïve crecidos en 40 mM de glucosa no presentan un aumento de la quimiotaxis al benzaldehído. Los nemátodos entrenados crecidos en 0 mM de glucosa presentan un aumento en la quimiotaxis indicando una memoria asociativa, lo cual no ocurre en los nemátodos crecidos en la condición de glucosa indicando que la memoria asociativa no se recupera en esta mutante. Cada punto representa un experimento independiente con aproximadamente 300 nematodos. Se utilizó una n=10. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media ± SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (naïve + 0 mM glucosa) se indican como sigue: \*\*\*p<0.001

Finalmente, hoy sabemos que distintos ambientes pueden modificar el epigenoma permitiendo a la célula y a los organismos adaptarse. La proteína SET-30 se encarga de catalizar la mono y di metilación de la lisina K4 de la histona H3, una marca asociada con activación transcripcional. Nuestros resultados mostraron que nemátodos mutantes de *set-30* no presentan un aumento en la quimiotaxis naïve cuando estos están expuestos a 40 mM de glucosa, similar a los nematodos WT (Fig 13). Así mismo los nematodos mutantes de *set-30* entrenados, tanto expuestos a glucosa como no expuestos a glucosa, no presentan un aumento en la quimiotaxis comparado con los nematodos naïve, indicando que SET-30 es necesaria para la formación de la memoria asociativa al benzaldehído. Estos datos indicarían que los mutantes en *set-30* tienen el mismo fenotipo que se observa en el WT, sugiriendo que SET-30 está involucrado en el cambio de comportamiento y pérdida de la memoria bajo la exposición a glucosa en *C. elegans*. Es importante recalcar que en estos experimentos se utilizó una concentración distinta de benzaldehído ya que se cambió el lote del reactivo. Debido a que los nematodos presentan una sensibilidad

considerable a los cambios en la concentración de odorantes, y que debido a su volatilidad estos tienen una estabilidad variable, fue necesario modificar la concentración usada (Figura suplementaria 3).



**Figura 13. SET-30 está involucrado en los cambios conductuales causados por exposición a glucosa.** Nematodos mutantes de SET-30 (set-30(gk315) X.) fueron expuestos a 40 mM de glucosa desde la ovoposición hasta adultos jóvenes (72h) y la quimiotaxis fue ensayada en condiciones basales (naïve) o en un protocolo de memoria asociativa entre el odorante y comida (entrenado). No se observó un aumento significativo en la quimiotaxis basal (naïve) de animales expuestos a 40 mM de glucosa, ni en los nematodos entrenados. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media ± SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (naïve + 0 mM glucosa) se indican como sigue: \*\*p<0.01 n=10 donde cada punto es un experimento independiente con aproximadamente 300 individuos.

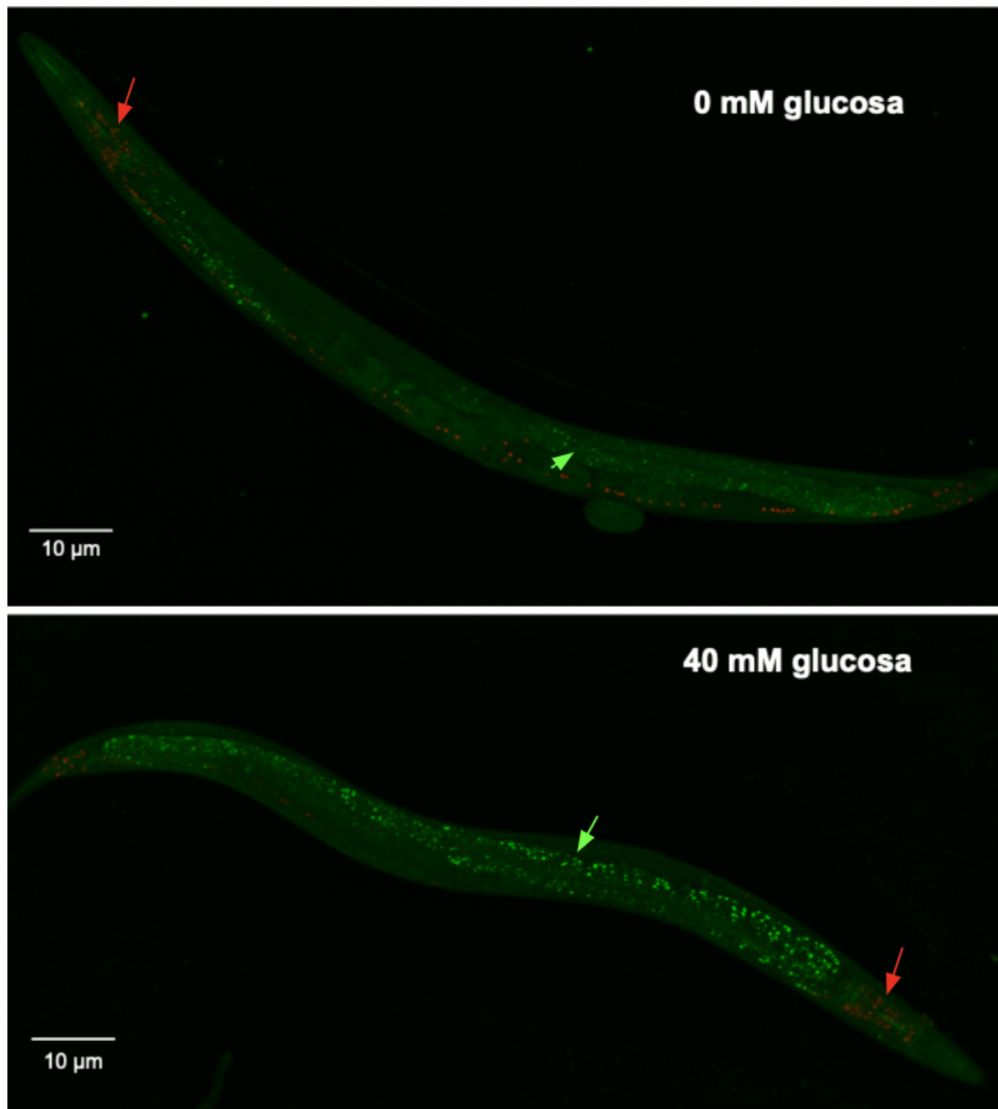
Nuestros datos demuestran que la exposición a 40 mM a glucosa causa cambios conductuales los cuales están regulados por la vía tipo insulina, SET-30, y HIF-1, mas no por SKN-1 (Tabla 1).

**Tabla 1. Vías analizadas sobre el fenotipo conductual y de memoria asociativa en exposición a glucosa y su involucramiento.** Donde el fenotipo sobre la atracción basal al benzaldehído se reporta como aumentada, lo cual indicaría que el gen no participa sobre el fenotipo, o no aumentada, indicando la participación del gen sobre el fenotipo. En el caso de la memoria asociativa ante glucosa se reporta como afectada cuando no hay una memoria asociativa a benzaldehído, indicando que el gen no participa sobre este fenotipo.

Vía	Gen	Cepa	Atracción basal al benzaldehído	Memoria asociativa ante glucosa	Referencia
	-	N2 (silvestre)	Aumentada	Afectada	Tesis licenciatura Zurita-León, 2020
Insulina	<i>daf-16</i>	GR1307 <i>daf-16(mgDf50)</i>	No aumentada	Afectada	Tesis licenciatura Zurita-León, 2020
	<i>daf-2</i>	DR1309 <i>daf-16(m26);daf-2(e1370)</i> ,	No aumentada	Afectada	Tesis licenciatura Zurita-León, 2020
	<i>age-1</i>	TJ1052 <i>(age-1(hx546) II.)</i>	No aumentada	Afectada	Este estudio
Estrés	<i>skn-1</i>	GR2245 <i>(skn-1(mg570) IV)</i>	Aumentada	No se pueden hacer conclusiones	Este estudio
	<i>hif-1</i>	ZG31 <i>(hif-1(ia4) V.)</i>	No aumentada	Afectada	Este estudio
Regulador epigenético	<i>set-30</i>	VC719 <i>(set-30(gk315) X.)</i>	No aumentada	No se pueden hacer conclusiones	Este estudio

Previamente habíamos observado que en mutantes de *crh-1* se recupera el fenotipo, es decir que estos nematodos no presentan un aumento en el comportamiento basal (Tesis licenciatura Zurita-León, 2020). Con base en esto nos preguntamos si la exposición a glucosa causa cambios en la actividad de CRH-1/CREB en el sistema nervioso y/o otro tejido, con un interés especial en el

sistema nervioso. Para determinar esto observamos en microscopía confocal a la cruce de la cepa *pcre::GFP*, la cual expresa GFP bajo un promotor CRE indicando actividad de CRH-1/CREB, y la cepa OH10690, la cual expresa RFP en neuronas, en 0 mM y 40 mM de glucosa (Fig 14). Observamos que los nematodos expuestos a 40 mM de glucosa tienen un aumento de GFP en el intestino indicando un aumento en la actividad de CRH-1/CREB. Así mismo no observamos cambios de GFP en el sistema nervioso; sin embargo, se necesita ampliar la muestra de nematodos observados para tener conclusiones definitivas.

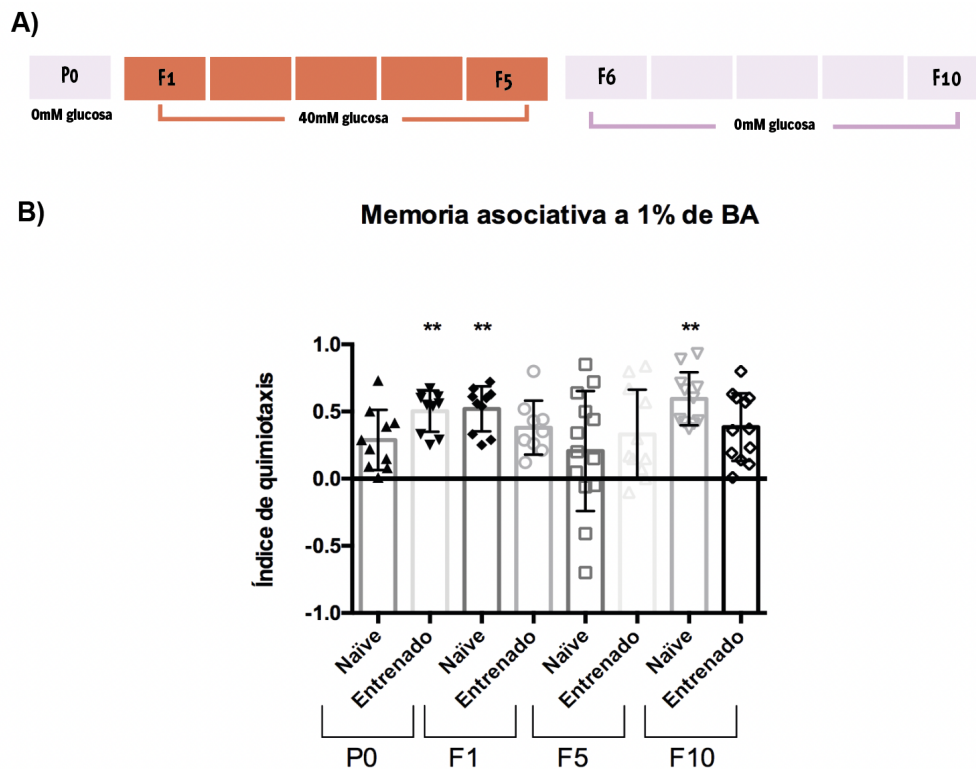


**Figura 14. La exposición a glucosa ambiental induce la actividad de CRH-1/CREB en el intestino.** Microscopía confocal de la cruce con *pcre::GFP* x OH10690 (*rab-3p(prom1)::2xNLS::TagRFP*) donde GFP está expresándose bajo un promotor tipo CRE y por lo tanto indica la actividad de CRH-1/CREB, y RFP se encuentra bajo el promotor de *rab-3* por lo que marca neuronas (flechas rojas). Se observa un aumento de actividad de CRH-1/CREB solo en el intestino (señalado con flechas verdes) de los nemátodos crecidos con 40 mM de glucosa en comparación con los nemátodos crecidos en 0 mM de glucosa.



## La exposición a glucosa durante cinco generaciones tiene efectos transgeneracionales sobre la conducta de *C. elegans*

Hay evidencia de que la exposición a un estímulo durante múltiples generaciones puede llevar a un fenotipo transgeneracional en *C. elegans* (Remy, 2010). Dado que observamos que una sola exposición a 40 mM de glucosa causa únicamente efectos intrageneracionales (ver antecedentes), nos preguntamos si la exposición repetida a 40 mM de glucosa durante varias generaciones de nematodos tendría efectos transgeneracionales sobre la memoria asociativa al benzaldehído y su quimiotaxis basal. Con base en esto, diseñamos un protocolo de múltiples exposiciones donde los nematodos fueron expuestos a 40 mM de glucosa durante cinco generaciones (F1-F5) y posteriormente se mantuvieron cinco generaciones más en condiciones control (F6-F10) (Fig. 15A). Se analizó la memoria asociativa a benzaldehído 1% en las generaciones P0, F1, F5 y F10.



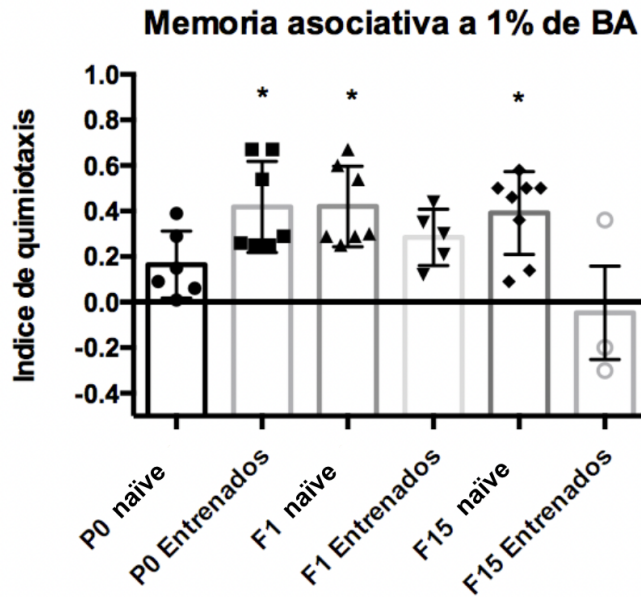
**Figura 15. La exposición a 40 mM de glucosa durante cinco generaciones tiene efectos transgeneracionales sobre la conducta y memoria asociativa a Benzaldehído. A)** Protocolo para evaluar el efecto transgeneracional de la exposición a glucosa en la cepa silvestre N2 de *C. elegans*. **B)** Memoria asociativa al 1% de BA de generaciones P0, F1, F5 y F10. En la F5, hay un aumento en la variación de los datos tanto en nematodos entrenados y control. Se observa que los nematodos pertenecientes a la F10 tienen un aumento significativo en la quimiotaxis basal comparado contra los nematodos



pertenecientes a la P0 sugiriendo un efecto transgeneracional. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (naïve + 0 mM glucosa) se indican como sigue: \*\*  $p < 0.01$   $n = 10$ , donde cada punto muestra un ensayo con aproximadamente 300 nemátodos.

Nuestros resultados demostraron que los nemátodos expuestos a alta glucosa ambiental por 5 generaciones (F1-F5) presentan una mayor variabilidad en la quimiotaxis basal que aquellos sin exposición a glucosa (P0) y con respecto a aquellos expuestos por una sola generación tanto en las condiciones de control como entrenados (F1) (Fig. 15B). Así mismo, se puede ver que no hay una diferencia entre los nemátodos de la F5 entrenados y control, indicando que no se bloquea el establecimiento de una memoria asociativa al benzaldehído ante la exposición continua a glucosa (Fig. 15B). Posteriormente se analizó la memoria asociativa y quimiotaxis al benzaldehído de nemátodos pertenecientes a 5 generaciones crecidos en medio con 0 mM de glucosa provenientes de 5 generaciones crecidos en 40 mM de glucosa (F10). Se observó que estos nemátodos tienen una quimiotaxis basal aumentada comparada con la de los nemátodos control nunca expuestos a glucosa (P0), fenotipo similar al observado en los nemátodos pertenecientes a la F1 expuestos a glucosa (Fig 15C) sugiriendo un fenómeno transgeneracional. Al someter a los nemátodos de la F10 al entrenamiento de memoria asociativa al benzaldehído, se observó que estos no presentan un aumento en el índice de quimiotaxis al compararlos con los nemátodos control de la misma generación. Estos resultados indican que no hay un aprendizaje asociativo al benzaldehído, sugiriendo que la exposición durante cinco generaciones a 40 mM de glucosa tiene efectos transgeneracionales sobre la quimiotaxis y memoria asociativa al benzaldehído que perduran por 5 generaciones.

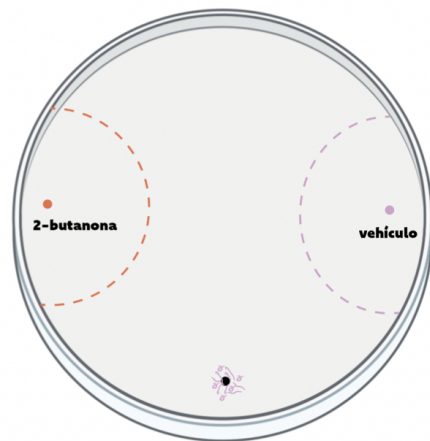
Debido a que la exposición durante 5 generaciones a 40 mM de glucosa presenta un fenotipo transgeneracional sobre el aprendizaje y quimiotaxis basal al benzaldehído, nos preguntamos cuánto duraba esta transgeneracionalidad. Se realizaron ensayos de quimiotaxis con nemátodos de 10 generaciones posteriores a 5 generaciones expuestos a glucosa (F15) para determinar si dicho fenotipo aún persistía (Fig. 16). Nuestros resultados preliminares muestran una tendencia en el aumento del índice de quimiotaxis en los nemátodos control de la F15 comparados con los nemátodos control pertenecientes a la P0. De igual manera en el caso de los nemátodos entrenados pertenecientes a la F15, estos muestran un decremento en la quimiotaxis indicando que no se está llevando a cabo el proceso de quimiotaxis. Dado a que estos resultados son preliminares consideramos que es necesario realizar un mayor número de repeticiones para poder tener una conclusión acertada.



**Figura 16. La exposición durante cinco generaciones a glucosa incrementa la quimiotaxis al benzaldehído por diez generacion (F15).** Se evaluó la memoria asociativa a 1% de BA de nematodos silvestres (N2) provenientes de 10 generaciones posteriores (F15) a nematodos que estuvieron expuestos por 5 generaciones a glucosa (F1-F5). Se observa una tendencia de disminución del índice de quimiotaxis en los nematodos entrenados de la F15 comparados con los nematodos F15 control sugiriendo que no existe una memoria asociativa. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas con respecto al control se indican como sigue: \*\*  $p < 0.01$  Cada punto muestra un ensayo con aproximadamente 300 nemátodos.

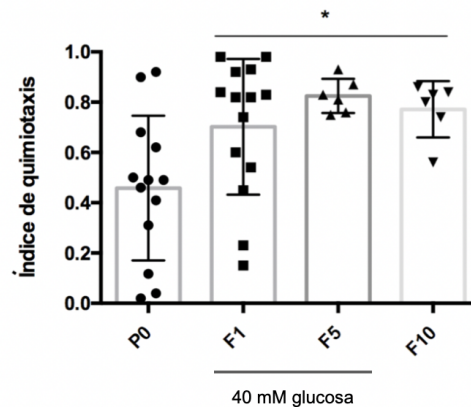
Debido a que la exposición a 40 mM de glucosa por 5 generaciones tiene efectos transgeneracionales sobre la conducta al odorante benzaldehído. Quisimos analizar si dicha transgeneracionalidad es exclusiva al benzaldehído o si afecta de manera global otras conductas. Como una primera aproximación se analizó la conducta basal de los nemátodos al odorante 2-butanona usando el diseño experimental previamente descrito en la Fig. 15A (Fig. 17). Se observó que los nematodos expuestos durante una generación a 40 mM de glucosa tienen una tendencia al aumento en la quimiotaxis al odorante 2- butanona. En el caso de los nematodos expuestos a 40 mM de glucosa durante cinco generaciones (F5), estos muestran un aumento en la quimiotaxis naïve la cual perdura hasta cinco generaciones posteriores a esta exposición (F10). Nuestros datos sugieren que el efecto transgeneracional de la exposición a glucosa por 5 generaciones no es específico a la conducta al benzaldehído pero parece ser un fenotipo global ante la quimiotaxis a odorantes volátiles.

A)



B)

### Quimiotaxis basal a butanona 0.1%

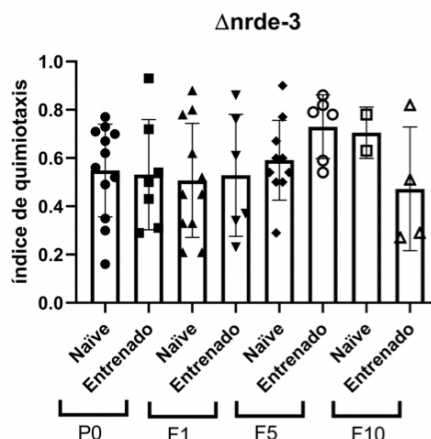


**Figura 17. La exposición a glucosa también tiene un efecto transgeneracional sobre la preferencia a 2-butanona.** A) Ensayo de quimiotaxis a 2-butanona en el cual se colocan tanto el odorante como el vehículo en los extremos de la caja y los nemátodos en el punto de origen. Se deja que los nemátodos migren y finalmente se calcula el índice de quimiotaxis. B) En nemátodos silvestres (cepa N2) se analizó la quimiotaxis basal a butanona al 0.1% en 0 mM y 40 mM de glucosa, al igual que en nemátodos expuestos durante 5 generaciones a 40 mM de glucosa (F5) y nemátodos crecidos por 5 generaciones en condiciones control pero provenientes de una exposición a glucosa por 5 generaciones (F10). Se observa un aumento significativo en el índice de quimiotaxis en nemátodos pertenecientes a las generaciones F1, F5 y F10. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (naïve + 0 mM glucosa) se indican como sigue: \* $p < 0.05$ . Cada punto muestra un ensayo con aproximadamente 300 nemátodos.

### Análisis de la vía de procesamiento de RNAi nuclear en el efecto transgeneracional de la exposición a glucosa

Nuestras observaciones demostraron que la exposición durante 5 generaciones a glucosa tiene efectos transgeneracionales sobre la memoria asociativa al benzaldehído los cuales perduran en la F10 y F15 (Fig 15 y 16). Se ha reportado que la vía de procesamiento de RNAi en el núcleo es necesaria para la herencia epigenética transgeneracional en *C. elegans* por lo que decidimos analizar la mutante de la proteína NRDE-3 para analizar su involucramiento sobre el fenotipo transgeneracional inducido por glucosa (Fig. 18). Observamos que los nemátodos mutantes en NRDE-3 pertenecientes tanto a la P0 y F1, entrenados y naïve, presentan una dispersión muy alta de la quimiotaxis. Debido a la variabilidad de los datos nos es difícil llegar a alguna conclusión sobre la participación de NRDE-3 sobre el fenotipo transgeneracional.

### Memoria asociativa a BA 1% de cepa YY158

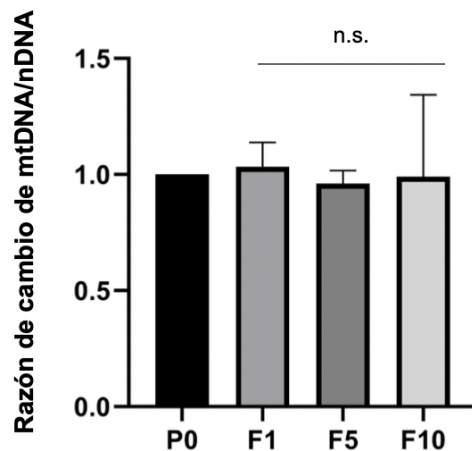


**Figura 18. Memoria asociativa al benzaldehído de la cepa YY158** En la cepa YY158 (*nrde-3(gg66)* X.) se realizaron ensayos de quimiotaxis de gusanos entrenados y control crecidos en 0 mM de glucosa y 40 mM de glucosa. Los nematodos pertenecientes a la P0 tienen una dispersión alta en los datos, tanto los entrenados como los naïve. Esta alta variabilidad se mantiene en el resto de las generaciones por lo que no se puede llegar a una conclusión concreta. Cada punto representa un experimento independiente con aproximadamente 300 nemátodos. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM.

### Efectos globales de la exposición a glucosa de manera transgeneracional

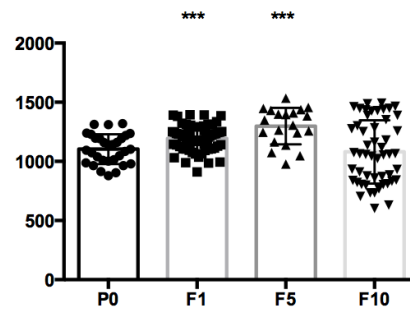
Se sabe que la exposición a glucosa afecta las mitocondrias ya que estas son sensibles a cambios metabólicos. Al ser una fuente importante de especies reactivas de oxígeno la disfunción mitocondrial es común ante dicha exposición. Con esto en mente decidimos cuantificar en *C. elegans* si la exposición a glucosa causa un aumento en la cantidad de mitocondrias o defectos en el genoma mitocondrial de manera transgeneracional después de la exposición por cinco generaciones. Para esto se analizó la razón de cambio entre la cantidad de DNA mitocondrial (mtDNA) contra la cantidad de DNA nuclear (nDNA) por qPCR. Nuestras observaciones demostraron que no hay un cambio en la cantidad de mtDNA ante la exposición a 40 mM de glucosa por una generación (F1) ni por exposición durante cinco generaciones (F5), comparados con la condición control (P0) (Fig 19). Así mismo no hay cambios en la generación crecida durante 5 generaciones en condiciones control que proviene de cinco generaciones de exposición a glucosa. Estos datos nos sugieren que la exposición a glucosa no afecta la cantidad de mitocondrias.

### Enriquecimiento de mtDNA



**Figura 19. Enriquecimiento de mtDNA en generaciones P0, F1, F5 y F10.** Cuantificación de la razón de cambio entre DNA mitocondrial y DNA nuclear medido por PCR cuantitativa de las generaciones P0, F1, F5 y F10. No se observaron cambios significativos entre condiciones. Se utilizó una n=3. Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM.

Por otro lado, nuestras observaciones previas y trabajos publicados demuestran que la exposición a glucosa causa un aumento en el tamaño y área de los nematodos de manera dependiente a la concentración. Con base en esto quisimos analizar si dicho aumento en tamaño perdura de manera transgeneracional. Se observó que los nematodos pertenecientes a la generación F1 y F5 tienen un aumento en su longitud comparado con los nematodos pertenecientes a la P0; sin embargo, no existe un aumento en los nematodos pertenecientes a la F10 (Fig. 20). Estos datos indican que la exposición a glucosa como nutriente causa un aumento en el tamaño de los nemátodos mas no de manera transgeneracional.



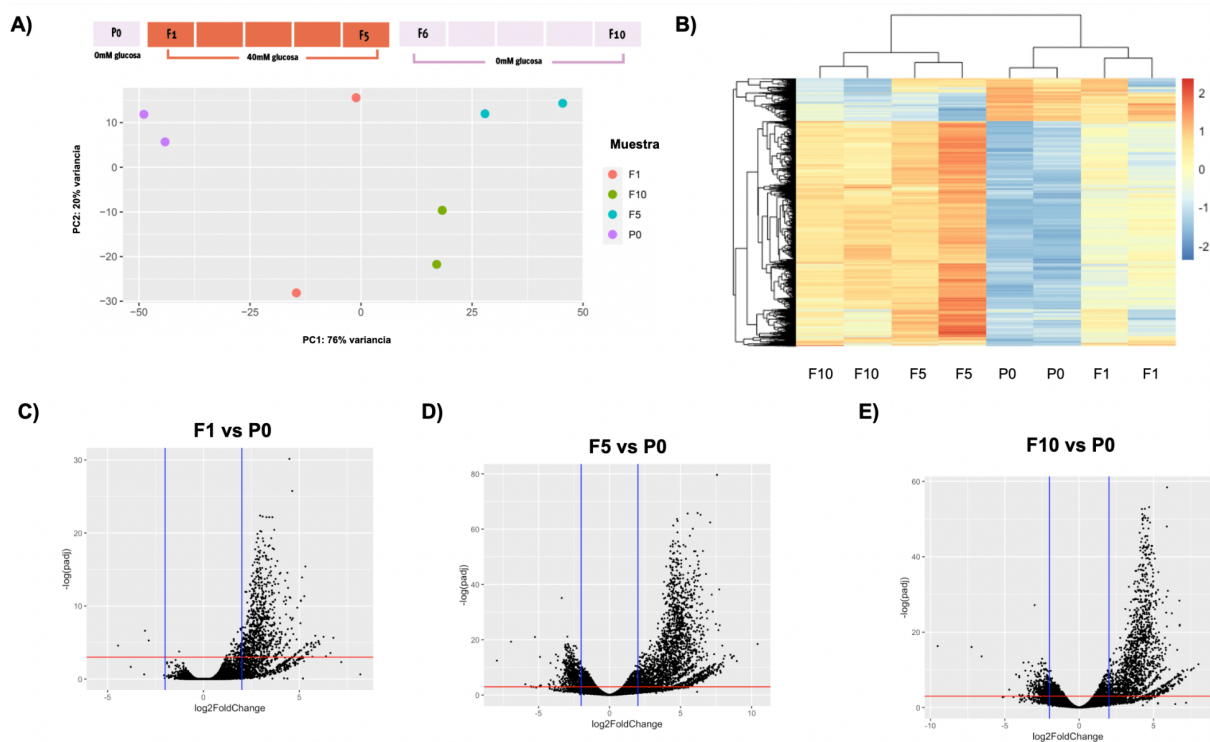
**Figura 20. El aumento de tamaño del nemátodo inducido por glucosa no es transgeneracional.** Se evaluó el tamaño de nemátodo de las generaciones P0, F1, F5 y F10 en gusanos silvestres (N2). Se observa un incremento significativo en el largo (medido en  $\mu\text{m}$ ) de los nemátodos pertenecientes a las generaciones F1 y F5 crecidos en 40 mM de glucosa comparado con los nemátodos no expuestos a glucosa (P0). En la F10 (5 generaciones crecidas sin glucosa después de la F5) no se observa un cambio estadísticamente significativo aunque sí una gran dispersión de los datos. Cada punto representa un nemátodo en estadio de adulto obtenidos en tres experimentos independientes,  $n = 50$ . Los datos fueron analizados por medio ANOVA de una vía y posteriormente se realizó una prueba de Tukey; los resultados se representan con media  $\pm$  SEM. Las diferencias significativas con respecto al control (naïve + 0 mM glucosa) se indican como sigue: \*\*\* $p < 0.001$

### La exposición a glucosa causa cambios transcripcionales

Para tener un mejor entendimiento de las vías genéticas involucradas y los mecanismos moleculares alterados por la exposición a glucosa en los nemátodos, decidimos determinar los cambios transcripcionales a nivel de genoma completo ante por la exposición aguda de una generación, la exposición crónica de cinco generaciones a glucosa y sus efectos transgeneracionales. Para esto se purificó RNA de cada condición (Fig 13A) y se hicieron librerías de RNA-seq para su secuenciación. El procesamiento inicial de los datos de RNA-seq se hizo con el apoyo del bioinformático Martí Wilson Verdugo. Uno de los parámetros que se utilizan para analizar la calidad de los datos de RNA-seq es el análisis por componentes principales (PCA). El PCA permite observar de manera multi-dimensional la similitud entre las muestras, por medio de un agrupamiento en el espacio con base a los componentes que aportan más a la varianza, lo cual tiene utilidad para detectar muestras atípicas o efecto de bache. El PCA de las muestras mostró un agrupamiento entre aquellas pertenecientes a la misma condición (P0, F1, F5, y F10), lo cual indica que los datos tienen una mayor similitud (Fig. 21A). Nuestros análisis de los datos de RNA-seq demostraron que la exposición durante una sola generación a glucosa (F1) causó un aumento en la expresión de aproximadamente 800 genes; sin embargo, causó únicamente la expresión a la baja



de sólo tres genes (Fig. 21 C) usando como corte una razón de cambio de -4 y 4 ( $\log_2\text{foldchange}$  -2 y 2) y una  $p$  ajustada de 0.05 como límite de corte. Entre los genes diferencialmente expresados en la F1 no observamos genes previamente asociados con exposición a glucosa. Los genes involucrados en la vía tipo insulina, *daf-2* y *daf-16*, al igual que *skn-1* y *hif-1*, no se encuentran diferencialmente expresados. Sin embargo, genes blanco de la vía tipo insulina y de *skn-1* si tienen una expresión diferencial. Por otra parte, tanto la exposición durante 5 generaciones (F5), como la condición de transgeneracionalidad (F10) tiene efectos en el aumento de la expresión de genes como en el decremento de su expresión (Fig. 21 C y E). En el caso de la F5 hay 2,024 genes sobreexpresados y 429 genes regulados regulados a la baja. Por otra parte, en la F10 hay 408 genes expresados a la baja y 1,494 genes expresados a la alta. Entre los genes expresados a la baja se encuentra *daf-2*. Estos datos indican que la exposición tanto en una sola generación a glucosa como durante cinco generaciones causa cambios en la expresión génica. De igual manera la exposición crónica a glucosa tiene efectos sobre la expresión génica cinco generaciones después de la exposición, es decir en la F10.



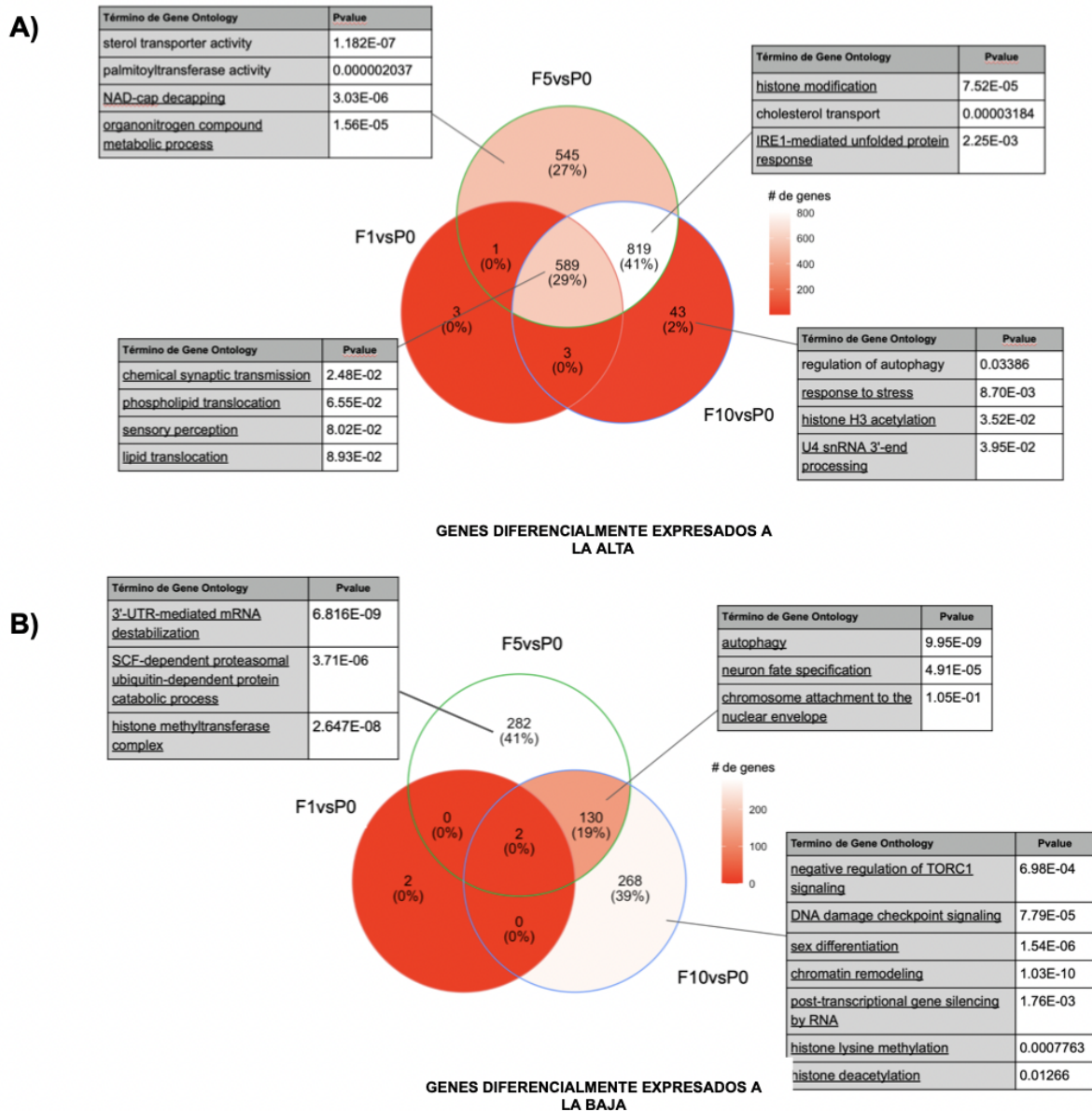
**Figura 21. La exposición a la glucosa causa cambios transcripcionales de manera transgeneracional.** **A)** Análisis de componentes principales (PCA) de las librerías secuenciadas de RNA-seq (duplicados biológicos). **B)** Heat-map de los genes diferencialmente expresados de todas las muestras. Para definir genes diferencialmente expresados en cada condición se utilizó un cambio en la expresión de -2 a 2 y una  $p$  adj de 0.05. **C-D)** “Volcano plots” de los genes diferencialmente expresados entre las generaciones

F1, F5 y F10 en comparación con gusanos no expuestos a glucosa (P0). Para definir genes diferencialmente expresados en cada condición se utilizó un cambio en la expresión de  $-2$  a  $2$  (líneas azules) y una  $p$ adj de 0.05 (línea roja).

Al analizar si los genes diferencialmente expresados se comparten entre estas condiciones se observó que en el caso de los genes regulados a la alta, el 29% de los genes se comparten entre F1, F5 y F10 (Fig. 22A). Consideramos que este set de genes representan genes que se inducen por la exposición a glucosa sin importar la temporalidad de la exposición y que se mantienen de manera transgeneracional. Entre estos genes se encuentran genes relacionados con fosforilación de proteínas, transporte de colesterol y percepción sensorial. Entre estos se encuentran genes blanco de la vía tipo insulina, SKN-1, y MXL-3. Por otra parte, entre las generaciones F5 y F10 se comparte el 41% de los genes sobreexpresados (Fig. 22A). En estos genes se encuentran principalmente genes relacionados con modificaciones de histonas, respuesta a estrés del retículo endoplásmico y otros genes relacionados con transporte de colesterol. Consideramos que estos genes constituyen genes de respuesta a la exposición crónica a glucosa que se mantienen de manera transgeneracional. Los genes que se sobre expresan exclusivamente en la F5 constituyen el 27% del total de genes sobre expresados en todas las comparaciones. Estos están relacionados con procesamiento de RNA y metabolismo de lípidos. Finalmente, entre los genes sobre regulados hay 43 genes exclusivos de la F10, los cuales constituyen el 2%. La ontología de procesos biológicos relacionados con estos genes es de regulación de la autofagia, procesamiento de RNAs pequeños nucleares (snRNAs), respuesta a estrés y acetilación de histonas. En el caso de los genes regulados a la baja, el 41% son exclusivos de la F5 (Fig. 22B). Estos genes se relacionan con desestabilización de RNAs y metiltransferasas de histonas. Consideramos que los genes diferencialmente expresados unicos para la F5 constituyen genes de exposición crónica a glucosa que no presentan transgeneracionalidad o genes involucrados en el establecimiento de la herencia epigenética transgeneracional. El 19% de los genes regulados a la baja se comparten entre la F5 y la F10, los cuales constituyen un grupo de genes que se inducen por exposición crónica a glucosa y se mantienen de manera transgeneracional. Estos genes se relacionan con autofagia, especificación neuronal, y unión de la cromatina a la envoltura nuclear. Los genes regulados a la baja unicos de la F10 constituyen el 39% del universo de DEGs. Este grupo de genes están relacionados con señalización por TOR, silenciamiento por RNA, modificaciones de histonas, y señalización por daño al DNA. Nuestros datos indican que la exposición aguda, de una sola generación a 40 mM de glucosa, causa cambios transcripcionales los cuales se mantienen si la exposición perdura. Sin embargo, la exposición crónica genera cambios transcripcionales distintos a aquellos generados por una exposición aguda. Estos cambios transcripcionales se mantienen en gran parte en la F10, indicando que la exposición cronica a glucosa tiene efectos transgeneracionales que perduran por lo



menos cinco generaciones posteriores a la exposición. Estos datos concuerdan con el fenotipo transgeneracional sobre la conducta observado previamente (Fig. 15), e indican que puede haber otros fenotipos transgeneracionales.



**Figura 22.** La exposición a glucosa durante una o cinco generaciones causa cambios transcripcionales en genes de metabolismo de lípidos y sensoriales que se mantienen de manera transgeneracional. **A)** Comparación de genes diferencialmente expresados a la alta entre las tres condiciones (F1, F5 y F10) en comparación con animales no expuestos a glucosa (P0) con términos de ontología de genes. **B)** Comparación de genes diferencialmente expresados a la baja entre las tres condiciones con términos de ontología de genes. La mayoría de los genes diferencialmente expresados en la F1 son compartidos con la F5 y F10, y están relacionados con percepción sensorial y metabolismo de lípidos. Los genes diferencialmente expresados exclusivos para la F5 y F10 están relacionados con metabolismo lipídico, modificaciones de histonas y procesamiento de

RNAs. Para estos análisis se usó un punto de corte de  $p_{adj}$  0.05 y  $-\log_2\text{foldchange}$  de -2 y 2.

## Discusión

### Los cambios conductuales por exposición a glucosa por una sola generación, dependen de la vía de insulina y HIF-1

La vía de la insulina en *C. elegans*, como en otros organismos, se regula parcialmente por el metabolismo de la glucosa, por lo que su análisis fue de interés para este proyecto. Esto concuerda con que la vía de insulina está involucrada en la reducción de la longevidad durante la exposición de los nematodos a alta glucosa (Lee *et al.*, 2019). Anteriormente observamos que las mutantes de DAF-16 (FOXO) recuperan la conducta basal al benzaldehído cuando son expuestos a glucosa, es decir que no presentan un aumento en la quimiotaxis naïve a este bajo la exposición a glucosa (Fig 2). Al ser este factor de transcripción el último efector de la vía tipo insulina quisimos analizar si la parte superior de la vía tipo insulina se encontraba involucrada. Observamos que la mutante de AGE-1, PI3K en mamíferos, al ser expuesta a glucosa no presenta un aumento de la atracción basal al benzaldehído; sin embargo, la memoria asociativa al odorante aumenta (Fig. 9). Nuestros datos indican que la participación de la vía de insulina sobre el cambio en la conducta originado por la exposición a glucosa proviene corriente arriba del efecto DAF-16, y por vía directa de DAF-2. Los datos generados en este trabajo, en conjunto con los datos obtenidos anteriormente corroboran que la vía tipo insulina está regulando los cambios conductuales hacía el benzaldehído causados por la exposición a glucosa, mas no las afecciones de la memoria asociativa. Se conoce que algunas conductas de quimiotaxis están reguladas por la vía de la insulina, tales como la quimiotaxis a  $\text{NaCl}_2$  (Tomioka *et al.*, 2006; Nagashima *et al.*, 2019). Ya que los nematodos mutantes en genes de la vía tipo insulina presentan una conducta similar a la de los nematodos WT (N2) consideramos que la vía de la insulina no está participando directamente en regular la conducta al benzaldehído. Sin embargo, es probable que un estado metabólico alterado cause una desregulación global por medio de la vía de la insulina que impacte directamente sobre el aprendizaje. Debido a que la vía de la insulina está actuando en distintos tejidos, incluyendo neuronas e intestino, consideramos de interés analizar si el efecto observado sobre la conducta está regulado de manera específica. Esto nos permitiría comenzar a comprender si el efecto de la vía de la insulina está actuando directamente sobre la conducta.

Por otro lado, la vía de SKN-1 está involucrada con la respuesta al estrés de distintos orígenes (An *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2009; Glover *et al.*, 2013). Debido a que este factor transcripcional está parcialmente regulado por la vía tipo insulina quisimos determinar si este estaba involucrado sobre los cambios conductuales y la afección a la memoria asociativa al benzaldehído causados por la exposición a 40 mM de glucosa. Nuestros resultados mostraron que la mutante de SKN-1 presenta el mismo fenotipo que la cepa silvestre N2 en presencia de glucosa (Fig 10). Esto sugiere que este factor de transcripción no está involucrado en el fenotipo

observado, aun cuando este factor transcripcional si está involucrado con la respuesta global a la exposición a glucosa (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2018). En *C. elegans* mutantes en SKN-1 crecidos en alta glucosa tienen una esperanza de vida mayor a los nemátodos silvestre expuestos a esta misma condición (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2018). De igual manera se ha observado que la isoforma SKN-1c está expresada a la baja en nemátodos expuestos a glucosa. Con base en esto, si la vía de SKN-1 estuviera involucrada en los fenotipos observados sobre la quimiotaxis al benzaldehído esperábamos ver que el fenotipo se recuperara. Aun cuando SKN-1 se ha asociado a integración neurosensorial de distintos estímulos quimiotácticos, nuestros datos coinciden con aquellos reportados que la quimiotaxis a benzaldehído no se ve afectada en mutantes de este factor transcripcional (Wilson *et al.*, 2017). Como mencionado anteriormente, en el sistema nervioso se expresa predominantemente la isoforma SKN-1b, la cual se ha asociado con respuesta a restricción calórica. Es probable que la expresión de esta isoforma no se vea afectada ante la exposición a glucosa, ya que solo se han visto cambios con la isoforma SKN-1c (Tartidas-Pallas *et al.*, 2021).

Por otra parte, también en este trabajo encontramos que al analizar los nemátodos mutantes de HIF-1, se observó que estos recuperan la conducta basal al benzaldehído cuando son expuestos a alta glucosa (Fig 11). Mutantes de HIF-1, al igual que nemátodos con RNAi de *hif-1*, tienen un aumento la esperanza de vida, aun cuando son expuestos a glucosa (Chen *et al.*, 2009; Alcantar-Fernandez *et al.*, 2018). HIF-1 también se está involucrado en el aumento de la esperanza de vida por restricción dietética en *C. elegans* (Chen *et al.*, 2009). En particular, su acción en neuronas serotoninérgicas es necesaria para que se observe dicho fenotipo. En *C. elegans* se ha asociado a la producción de serotonina con la esperanza de vida (Murakami *et al.*, 2007). Se ha propuesto que HIF-1 puede estar regulando la producción de serotonina (Chen *et al.*, 2009; Leiser *et al.*, 2016). Se sabe que el circuito neuronal del benzaldehído es dependiente de serotonina, por lo cual HIF-1 podría estar actuando en las mismas neuronas bajo la exposición a glucosa causando cambios conductuales. Sin embargo, sería necesario analizar con mayor detalle por medio de una mutante nula específica en estas neuronas para determinar si este es el caso.

Hoy en día se conoce que los estímulos ambientales pueden modificar los patrones de expresión a partir de cambios en modificaciones de histonas, por lo que fue de nuestro interés analizar si estos estaban implicados en los efectos conductuales inducidos por glucosa. Como una primera aproximación analizamos la conducta y memoria asociativa al benzaldehído de la cepa mutante de SET-30, metiltransferasa de H3K4me1 y H3K4me2. Nuestros resultados demostraron que los nemátodos mutantes a SET-30 expuestos a glucosa no presentan cambios en la quimiotaxis naïve, indicando que esta proteína está involucrada en este fenotipo. Así mismo observamos que tanto los nemátodos expuestos a glucosa como aquellos en las

condiciones control no presentan memoria asociativa al benzaldehído. La metilación de H3K4 se ha implicado en la formación de la memoria asociativa en modelos de condicionamiento al miedo (Gupta, *et al.*, 2010). De igual manera ratones mutantes en metiltransferasas de H3K4 en la corteza prefrontal tienen déficits en la memoria espaciotemporal (Kerimoglu *et al.*, 2013, Jakovcevski *et al.*, 2015), por lo que nuestros resultados concuerdan con la literatura sobre la importancia de la metilación de H3K4 en la memoria asociativa. Es importante recalcar que durante estos ensayos se utilizó una concentración menor de benzaldehído (0.33% en vez de 1% de benzaldehído), debido a que los nematodos tenían una quimiotaxis basal aumentada. Se conoce que los nematodos son extremadamente sensibles a distintos estímulos externos, como temperatura, los cuales impactan en la quimiotaxis de los nemátodos (Paridas *et al.*, 2014). Debido a esto y a diversas observaciones en el laboratorio consideramos que el aumento en la quimiotaxis basal de los nemátodos SET-30 no se debe a efectos de la cepa, si no a efectos ambientales no controlables.

Previamente habíamos observado que la exposición a 40 mM de glucosa causa un aumento en la quimiotaxis basal al benzaldehído e inhibe la memoria asociativa a este odorante. El fenotipo sobre la quimiotaxis basal se revierte en distintas mutantes, indicando que la vía tipo de insulina, HIF-1 y CRH-1/CREB están involucradas; sin embargo, aún no se ha caracterizado una vía involucrada sobre los efectos de la glucosa sobre la memoria asociativa o aprendizaje. Debido a la variedad de vías involucradas sobre el cambio en la quimiotaxis, consideramos que este fenotipo es bastante pleiotrópico; sin embargo, el fenotipo sobre la memoria se debe probablemente a un cambio más puntual. Se ha reportado que CRH-1/CREB es esencial para la memoria asociativa (Kauffman *et al.*, 2010). Así mismo se sabe que bajo 100 mM de glucosa la expresión de *crh-1* aumenta (Alcántar-Fernández *et al.*, 2019). Anteriormente habíamos observado en el laboratorio que mutantes de *crh-1* no tienen un aumento en la quimiotaxis al crecer en 40 mM de glucosa, indicando que CRH-1/CREB está involucrado en los efectos de la glucosa sobre la conducta. Con base en estos datos consideramos que la regulación de este factor transcripcional pueda también estar participando sobre los efectos en la memoria asociativa por exposición a glucosa. Debido a que la mutante de CRH-1/CREB no presenta memoria asociativa, no es posible analizar los efectos de la glucosa sobre esta por lo que es necesario utilizar otras estrategias.

Por otra parte, para determinar si el efecto de la glucosa en la conducta basal al benzaldehído se debe a la expresión de *crh-1* en neuronas se utilizó una cruce de la cepa OH10689 con la cepa p:cre, permitiendo observar actividad de CRH-1 en GFP y a las neuronas marcadas con RFP. Nuestras primeras aproximaciones mostraron que existe un aumento en la actividad de CRH-1 como factor transcripcional en el intestino cuando los nematodos se exponen a 40mM de glucosa (Fig 14) . Por otro lado, se sabe que la restricción alimentaria afecta la actividad de *crh-1* y afecta la memoria a largo plazo, por lo que su participación en el fenotipo observado con

glucosa concuerda con que CRH-1/CREB está regulado por estímulos nutricionales (Kauffman *et al.*, 2010). Nuestros resultados muestran los efectos de la exposición a glucosa sobre la actividad de CRH-1/CREB. Para poder determinar si existe una actividad diferencial de este factor transcripcional durante la quimiotaxis al benzaldehído y en la memoria asociativa, sería necesario observar a los nematodos durante una exposición a benzaldehído al igual que durante la evocación de la memoria. Consideramos probable que cambios en la actividad de CRH-1/CREB en neuronas solo se puedan apreciar bajo estas condiciones. De igual manera, el análisis de RNAi en tejidos específicos permitirá determinar con mayor exactitud en qué tejidos es necesaria la actividad de CRH-1/CREB dentro de nuestro fenotipo.

Una pregunta relevante que ha surgido en el estudio de los efectos de la glucosa en *C. elegans* es si los fenotipos observados surgen de la exposición de *C. elegans* a la glucosa directamente, o bien, del hecho de que los nemátodos están ingiriendo bacteria que está expuesta a glucosa. Se conoce que los cambios en la fuente nutricional de las bacterias afectan la salud de los nemátodos (Cabreiro *et al.*, 2013). Para determinar si el fenotipo observado sobre la conducta al benzaldehído y sobre la memoria asociativa se debe a la exposición directa a glucosa o a la exposición de la bacteria a glucosa, realizamos ensayos de quimiotaxis al benzaldehído con nematodos crecidos en bacteria muerta (Suplementaria 1). En este contexto nosotros observamos un aumento en la quimiotaxis naïve y una pérdida del aprendizaje, sugiriendo que el fenotipo observado se da por la exposición directa de los nemátodos a la glucosa. Recientemente se observó que al crecer la bacteria *E. coli* en medio suplementado con bacteria, anterior a plaquear está en la caja de los nematodos, causa una disminución en la longevidad y decrementa resistencia a estrés (Kingsley *et al.*, 2021). Estos datos sugieren que los metabolitos producidos por las bacterias en presencia de glucosa, causan efectos deletéreos en el nemátodo. Debido a esto no descartamos que los metabolitos bacterianos producidos por el contacto con glucosa puedan estar teniendo un efecto sobre los nemátodos y su conducta. Sería de interés analizar si crecer las bacterias en medio adicionado con glucosa y retirar ese medio tiene efectos sobre la conducta.

### **La exposición crónica a glucosa causa cambios en la conducta de manera transgeneracional**

El que un estímulo ambiental pueda afectar a las generaciones subsecuentes ha sido un tema controvertido, pero desde el punto de vista evolutivo, el que la progenie de un organismo este ya pre-adaptada a las condiciones ambientales a las que se enfrentan sus progenitores tiene claras ventajas para la supervivencia de la especie. Cuando una herencia perdura más de tres generaciones después de la exposición, esta se puede considerar un mecanismo de herencia epigenética transgeneracional (TEI por sus siglas en inglés). En particular, en *C. elegans* se ha

reportado que la exposición a un estímulo durante varias generaciones puede llevar a cambios transgeneracionales. Anteriormente habíamos observado que la exposición a 40 mM de glucosa causa cambios intergeneracionales, mas no transgeneracionales. Con base a esto nos preguntamos si la exposición prolongada, (durante varias generaciones) a 40 mM de glucosa causa cambios transgeneracionales sobre la conducta y memoria asociativa a benzaldehído. Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la exposición constante durante cinco generaciones a glucosa causa un fenotipo transgeneracional sobre la conducta y la memoria asociativa a benzaldehído (Fig. 15) y que este fenotipo perdura hasta cinco generaciones después del estímulo (F10). Es importante mencionar que en el caso de los nemátodos expuestos durante cinco generaciones a 40 mM, estos presentan un aumento en la variabilidad de la quimiotaxis basal (naïve) al BA. Consideramos que este efecto se puede deber a que la exposición crónica a glucosa causa que los nemátodos no puedan adaptarse de la manera correcta a distintos cambios ambientales, por lo que estos serían mas sensibles a cambios ambientales que puedan afectar la quimiotaxis. Se sabe que tanto el espermatozoides como el óvulo pueden dar la información necesaria para determinar un fenómeno de herencia epigenética transgeneracional (TEI) (Dunn & Bale, 2011, Fullston *et al.*, 2013, Camsari *et al.*, 2019). Sería de interés analizar si la herencia transgeneracional observada ante la exposición a glucosa proviene de herencia materna o paterna, y si existe un peso diferencial en el bagaje genético entre espermatozoides y óvulo en nuestro modelo experimental. Existen datos que indican que el fenotipo epigenético puede perderse después de determinadas generaciones (Moore *et al.*, 2019). Debido a esto decidimos analizar si el fenotipo observado por alta glucosa dura hasta 10 generaciones posteriores al estímulo de glucosa, es decir hasta la F15. Nuestros datos mostraron que los nemátodos pertenecientes a la F15 presentan aún un aumento en la quimiotaxis naïve al benzaldehído y, en el caso de los nemátodos entrenados, no presentan memoria asociativa al benzaldehído (Fig. 15). Más experimentos deben realizarse para definir si el fenotipo observado se pierde después de más generaciones lo que también sería importante desde el punto de vista ecológico para permitir a los organismos adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes. Hasta ahora no se conoce como es que la herencia epigenética transgeneracional se pierde ni cómo se regula en qué punto esto sucede, por lo que nuestro modelo podría ser una excelente opción el estudio de estos procesos.

Por otro lado, *C. elegans* es capaz de responder a distintos estímulos de odorantes, por lo que fue de nuestro interés determinar si los cambios conductuales por la exposición a glucosa son exclusivos del benzaldehído. Al analizar la conducta basal de la generaciones F5 y F10 a 2-butanona observamos que la quimiotaxis al odorante se ve afectada de manera transgeneracional con la exposición durante cinco generaciones a 40 mM de glucosa (Fig. 16). Estos datos sugieren que dichos cambios transgeneracionales no son exclusivos sobre la conducta al benzaldehído. Cabe mencionar que tanto el benzaldehído como la 2-butanona son detectados por

la neurona AWC (Bargmann and Horvitz, 1991). Para determinar si el efecto ocurre de manera general en todo el sistema nervioso, sería de interés analizar la conducta a otros odorantes y a estímulos no olfativos en nematodos silvestres o mutantes carentes de la neurona AWC. Esta estrategia ayudaría a definir el papel del sistema nervioso en el establecimiento del fenotipo transgeneracional.

Por otro lado, dado que se ha reportado que en *C. elegans* la TEI está mediada por RNAs pequeños, y modificaciones de histonas, decidimos analizar cuáles de estas vías están involucradas sobre el fenotipo transgeneracional observado ante la exposición a glucosa. Como una primera aproximación se utilizaron nematodos mutantes en *nrde-3* (Fig 18). Observamos una alta variabilidad en la quimiotaxis de los mutantes en todas las generaciones, incluyendo los nematodos nunca antes expuestos a glucosa. Cabe mencionar que los ensayos de quimiotaxis transgeneracional se hacen de manera pareada con todas las generaciones. Debido a esto consideramos difícil poder llegar a una conclusión acertada sobre el papel de NRDE-3 sobre el fenotipo observado. Se ha reportado que cepas mutantes en la vía de RNAi, específicamente en gónada, son sensibles a la temperatura como la mutante de HRDE-1. Es posible que mantener a los nematodos mutantes en NRDE-3 a 20°C, como se hizo en este trabajo, al igual que su manejo para el mantenimiento a temperatura ambiente, pueda estar causando un estrés que causa cambios en el comportamiento que imposibilitan obtener resultados concluyentes. Es claro que sería necesario analizar con mayor detalle la respuesta de NRDE-3 al estrés para determinar si esta es la respuesta a la variabilidad observada. Consideramos que mantener a los nemátodos en 15°C podría ser una buena alternativa para disminuir el estrés ambiental, y que podría ayudar a disminuir dicha variabilidad.

Debido a que la exposición a glucosa causa efectos globales sobre los organismos, consideramos de interés analizar si el fenómeno de TEI observado se daba únicamente en el sistema nervioso. Como una primera aproximación analizamos el tamaño de los nematodos pertenecientes a las generaciones F5 y F10. Como mencionado anteriormente, se ha caracterizado que la exposición a los nemátodos a altas concentraciones de glucosa tiene como consecuencia un aumento en el largo y en el área total de los nematodos (tesis de licenciatura Mariana Zurita y Alcantar-Fernandez et al., 2018). En este trabajo observamos que los nematodos crecidos durante una y cinco generaciones en 40 mM de glucosa tienen un aumento en el tamaño, pero que este fenotipo no se hereda a los nematodos de la generación F10 (Fig 19). Cabe mencionar que observamos un aumento en la dispersión del tamaño de los nematodos pertenecientes en la F10. Esto podría deberse a un retraso durante el desarrollo; sin embargo, sería necesario analizar con mayor precisión el tiempo en cada estadio larvario de estos nematodos para poder determinar si esto está ocurriendo. El incremento en el tamaño se asocia principalmente a un aumento en el volumen celular y en la cantidad de lípidos. Anteriormente se ha observado que la adición de lípidos al medio causa un aumento



en la concentración lipídica en los nemátodos de manera intergeneracional; sin embargo, en este modelo no se ha observado si existe un aumento del tamaño (Wan et al., 2022). Con base en la información de la literatura consideramos que nuestros datos pueden dar un indicio sobre que el metabolismo lipídico no se afecta de manera transgeneracional. Pero para poder determinar con precisión esto sería necesario analizar la acumulación de lípidos o la expresión de genes involucrados en este proceso en la F10.

Otro de los efectos observados tras la exposición a alta glucosa es el aumento en el estrés oxidativo (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2018). La mayoría de los estresores celulares tienen repercusiones en la mitocondria donde uno de los mecanismos para restablecer la homeostasis mitocondrial es la activación de la respuesta mitocondrial a proteínas mal plegadas, o mtUPR (Zhao *et al.*, 2002) que se activa por ROS, metabolismo alterado, proteínas mal plegadas en la mitocondria y defectos en el genoma mitocondrial (Shpilka & Hanes, 2018). Se ha caracterizado que la activación de la respuesta mtUPR en neuronas de *C. elegans* se puede heredar a futuras generaciones de manera sistémica (Zhang *et al.*, 2021) y se ha observado que la activación de la respuesta mtUPR puede causar un aumento en la cantidad de DNA mitocondrial (Lin *et al.*, 2016). De igual manera se ha observado que la exposición a 100 mM de glucosa puede causar disfunción mitocondrial (Alcantar-Fernandez *et al.*, 2019). Con base en estos datos quisimos analizar si la exposición durante cinco generaciones a 40 mM de glucosa causaba un aumento en la cantidad de DNA mitocondrial y si este se podía heredar transgeneracionalmente. Sin embargo, nuestros datos indican que no existe un cambio en la cantidad de mtDNA con respecto al gDNA ante la exposición a glucosa por 5 generaciones y por lo tanto, tampoco de manera transgeneracional (Fig 18). Nuestros datos concuerdan con aquellos publicados por Alcantar-Fernandez (2019), en que una sola exposición a 40mM no causa cambios significativos en la cantidad de DNA. Sin embargo, consideramos un dato importante el que un tiempo prolongado de exposición a glucosa no cause dicho efecto. Debido a que a 100 mM de glucosa se han observado dichos cambios, estudiar si tal exposición puede causar cambios transgeneracionales en el número de mitocondrias necesita ser estudiado.

### **La exposición a glucosa causa cambios transcripcionales**

Tanto a nivel celular como de un organismo completo, la exposición a glucosa a niveles patológicos tiene diversos efectos a distintos niveles tales como alteraciones metabólicas y mitocondriales además de su papel como un estresor osmótico y un inductor de estrés oxidativo (Brownlee, 2001; Aronson, 2008; Luo *et al.*, 2016). Para determinar los efectos transcripcionales globales de la exposición a glucosa sobre *C. elegans*, evaluamos los efectos de exponer a los nematodos a un medio ambiente con glucosa durante una generación (F1; exposición aguda), y durante cinco generaciones (F5; exposición crónica). Para esto realizamos RNA-seq de RNA total obtenido de nemátodos expuestos a 40 mM de glucosa durante una y cinco

generaciones, además de aquellos que después de cinco generaciones regresaron a ser cultivados sin glucosa por cinco generaciones más (F10; efecto transgeneracional). El análisis de nuestros datos de RNA-seq demostró que tanto la exposición aguda (F1) como crónica (F5) tienen efectos sobre la expresión génica en vías enriquecidas con transporte de lípidos y percepción sensorial (Fig. 20 y 21), los cuales se mantienen en la F10. Entre los genes diferencialmente expresados compartidos entre estas condiciones se encuentran genes blanco de la vía tipo insulina, lo cual concuerda con los datos obtenidos en este trabajo de que esta vía está involucrada. Otra vía cuyos genes blancos se encuentran diferencialmente expresados por la exposición a glucosa es MXL-3. MXL-3 es un factor transcripcional que regula la lipólisis y la acumulación de lípidos (Rourke & Ruvkun, 2013). En condiciones de alta glucosa se ha observado que MXL-3 se transloca al núcleo inhibiendo la transcripción de la lipólisis, y en conjunto con SBP-1 aumenta la transcripción de genes lipogénicos causando la acumulación de lípidos en los nematodos (Mejia-Martinez et al., 2017). Así mismo se ha observado que MXL-3 se expresa principalmente en el intestino y en la neurona sensorial AWC (Rourke & Ruvkun, 2013). Debido a que la vía de percepción del benzaldehído depende de la neurona AWC, consideramos la actividad de MXL-3 de interés para este proyecto. Futuros experimentos para silenciar a MXL-3 exclusivamente en esta neurona serán necesarios para definitivamente validar su participación en los efectos de la glucosa sobre *C. elegans*.

Es interesante que la mayor parte de los genes sobreexpresados en la F1 se comparten con la F5 y la F10; sin embargo, existen genes exclusivamente sobreexpresados para estas últimas dos condiciones. En particular, los genes con expresión diferencial, tanto sobre-expresados como expresados a la baja, únicos para la F5 y la F10 están relacionados con vías de procesamiento de RNA y modificaciones de histonas. Se sabe que el proceso de herencia epigenética transgeneracional está regulado por la vía de procesamiento de RNAs en la gónada y por marcas de histonas (Vastenhow, et al., 2006; Buckley et al., 2012; Buckhart et al., 2011). Entre los genes diferencialmente expresados en estas generaciones se encuentran diversas metiltransferasas, incluyendo a SET-2 y SET-16. Estas proteínas son metiltransferasas de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4), la cual es una marca de activación (Xiao et al., 2011). Esta marca se ha asociado previamente con efectos transgeneracionales sobre la esperanza de vida, y sobre el metabolismo de lípidos tras estrés nutricional en *C. elegans* (Geer et al., 2011; Wan et al., 2022). Dado estos resultados consideramos que los efectos transgeneracionales observados por la exposición a glucosa podrían estar mediada por la metilación de la H3K4 aunque su participación deberá ser demostrada experimentalmente. En el caso de los genes diferencialmente expresados en la F1 respecto a nemátodos no expuestos a glucosa se encuentran genes blanco de la vía tipo insulina, SKN-1 y MXL-3. Interesantemente, en la F1 no detectamos genes alterados en vías de procesamiento de RNAs y de modificaciones de histonas. Estos datos concuerdan

con las observaciones previas que una sola exposición a glucosa no genera un fenotipo transgeneracional (Fig. 9) (Tesis de Licenciatura Zurita-León 2020).

Como fue mencionado anteriormente, en las tres condiciones hay genes diferencialmente expresados relacionados con vías de percepción sensorial. Entre estos se encuentra el gen B0207.7, el cual es un activador putativo de la actividad de serina/treonina cinasa y se expresa únicamente en las interneuronas AIY (Manning, 2005). El circuito capaz de sensar el benzaldehído y la 2- butanona depende de la interneurona AIY, por lo que desregulaciones en este gen podrían explicar los cambios en la conducta de estos odorantes observados en este trabajo.

## Conclusiones

1. La exposición aguda a glucosa durante una sola generación causa un incremento en la atracción basal al benzaldehído dependiente de la vía tipo insulina, AGE-1; la metiltransferasa de histonas, SET-30; y la vía del factor inducido por hipoxia, HIF-1.
2. La exposición crónica a glucosa durante cinco generaciones causa un incremento en la atracción basal al benzaldehído y 2-butanona, e inhibe la memoria asociativa a benzaldehído de manera transgeneracional.
3. Los efectos transgeneracionales de la exposición durante cinco generaciones a glucosa no afectan la cantidad de DNA mitocondrial, ni afectan el tamaño de los nemátodos.
4. La exposición aguda a 40 mM de glucosa, durante una sola generación, causa cambios transcripcionales en genes relacionados con el metabolismo lipídico y la percepción sensorial.
5. La exposición crónica, de cinco generaciones a 40 mM de glucosa causa cambios transcripcionales distintos a aquellos generados por la exposición aguda, de los cuales algunos de ellos se mantienen de manera transgeneracional; sin embargo, existen cambios transcripcionales únicos que surgen en el modelo de transgeneracionalidad (F10).

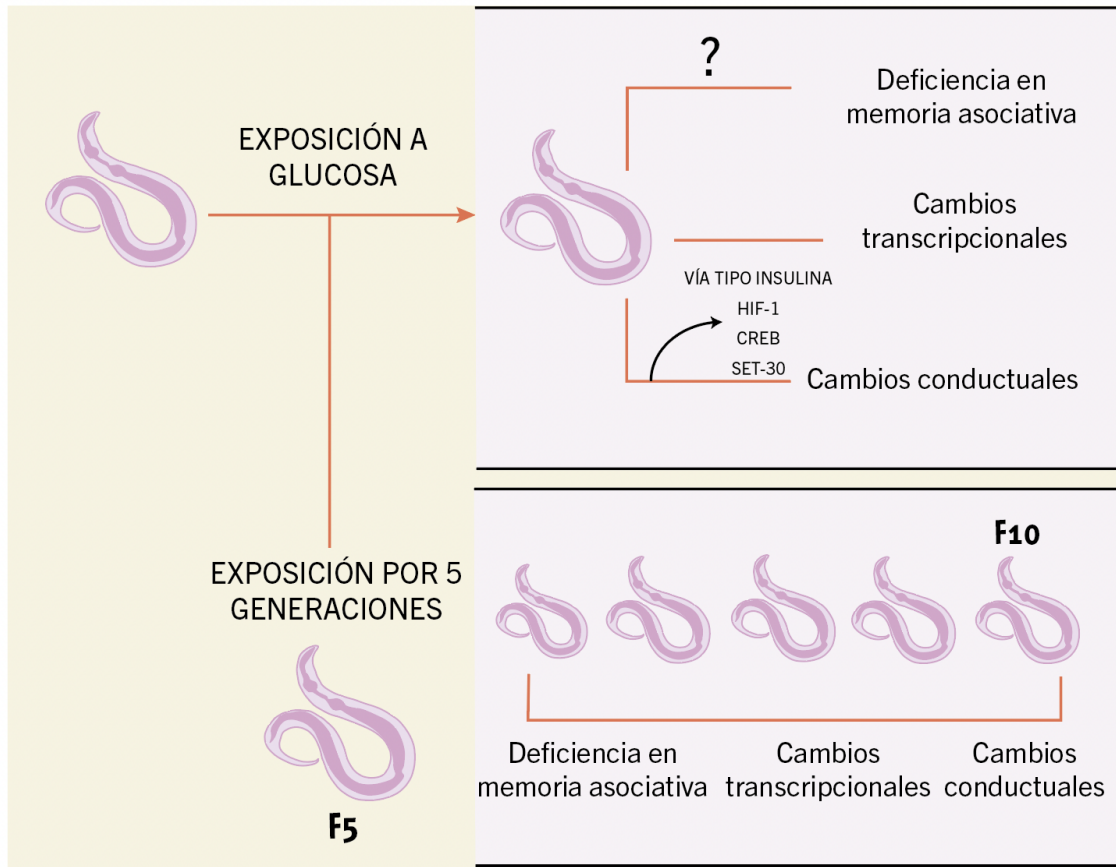


Figura 23. Resumen gráfico de las principales conclusiones de este trabajo.

## Perspectivas

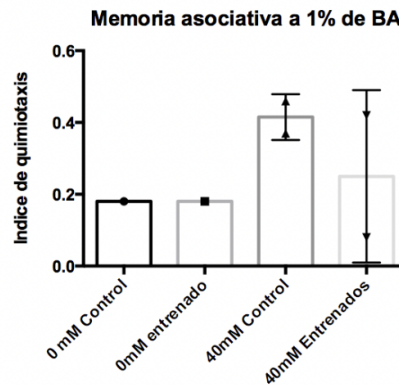
Para poder entender con mayor precisión los efectos causados por la exposición a glucosa de manera aguda y crónica consideramos que sería necesario analizar otros fenotipos no relacionados con la conducta. En el caso de los efectos de la exposición durante una sola generación a 40 mM de glucosa consideramos de interés analizar con mayor detalle los efectos de la glucosa en las mitocondrias y el estrés oxidante de los nemátodos. Como una primera aproximación se podría analizar el metabolismo mitocondrial usando colorantes para medir la producción de radicales libres por medio de microscopía o por citometría de flujo. De igual manera sería interesante analizar como se encuentra la acumulación y el metabolismo de lípidos en los nematodos tras la exposición crónica a glucosa, y si existen cambios en la condición de transgeneracionalidad.

Por otra parte, no sabemos como tal si los efectos sobre la conducta observados por la exposición a glucosa se deben por la acción de las vías involucradas en el sistema nervioso o en otros tejidos, por ejemplo el intestino. El efecto de la glucosa puede ser diferencial dependiendo del tejido analizado, por lo que sería importante analizar la expresión diferencial de genes exclusivamente en células neuronales por medio de RNA-seq o RT-qPCR de genes específicos a partir de neuronas sorteadas. Además, el uso de RNAs de interferencia tejido específico en neuronas también podría permitirnos observar el efecto de distintas vías en el sistema nervioso sobre el fenotipo observado. Principalmente consideramos que CRH-1/CREB es de interés para dicho análisis, ya que en este trabajo observamos que existe un aumento en su actividad en el intestino tras la exposición a glucosa (Fig. 14). Por otra parte, silenciar específicamente a los genes MXL-3 y B0207.7 en las neuronas AWC y AIY, respectivamente, o bien su rescate tejido específico en animales mutantes podría definir definitivamente su participación en el fenotipo conductual observado por la exposición a glucosa.

Como se mencionó previamente, sería de gran interés analizar si la exposición a 40 mM de glucosa durante cinco generaciones resulta en otros fenotipos de manera transgeneracional. En particular sería interesante analizar si los nemátodos de la F10 tienen un decremento en la esperanza de vida, ya que este fenotipo se ha observado en nematodos expuestos a alta glucosa. Así mismo queda como perspectiva el validar las vías involucradas sobre la transgeneracionalidad observada, en particular las vías de procesamiento de snRNAs al igual que *readers*, *writers* y *erasers* de marcas de histonas. En particular, se sabe que la marca de activación H3K4me3 está involucrada con la transgeneracionalidad de acumulación de lípidos bajo dietas altas en grasa (Wan et al., 2022) y metiltransferasas encargadas de depositar esta marca están reguladas diferencialmente en la F5 y F10, por lo que consideramos que esta marca podría jugar un papel central en el establecimiento del fenotipo transgeneracional inducido por glucosa. El análisis de los niveles de esta marca por Western Blot y/o Cut and Run serían enormemente informativos. Finalmente, ya que los snRNAs están implicados en la herencia epigenética transgeneracional, secuenciar RNAs pequeños de gónada podría proveer información importante para entender este fenotipo con mayor precisión.



## Figuras suplementarias



**Figura suplementaria 1. La exposición a glucosa causa cambios en el comportamiento al benzaldehído, sin importar el metabolismo bacteriano.** Para evaluar la dependencia a ser alimentados con bacterias vivas o muertas, se realizaron ensayos para evaluar la quimiotaxis a benzaldehído al 1% con nematodos crecidos en 0 mM de glucosa y 40 mM a los que se les realizó el protocolo de memoria asociativa en placas de NGM con bacteria inactivada por calor. Nuestros resultados preliminares muestran que la exposición a glucosa y bacteria muerta resultó en un aumento en la quimiotaxis basal comparados con los nematodos naïve crecidos en 0 mM de glucosa. Importantemente no se observa un incremento en la quimiotaxis de los nemátodos entrenados crecidos en 0 mM de glucosa, sugiriendo que es necesario exponer a los nemátodos a una bacteria viva para que se forme la memoria asociativa.



## Referencias

Abay-Nørgaard, S., Attianese, B., Boreggio, L., & Salcini, A. E. (2020). Regulators of H3K4 methylation mutated in neurodevelopmental disorders control axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Development (Cambridge, England)*, 147(15), dev190637. <https://doi.org/10.1242/dev.190637>

Ahmed N. (2005). Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes research and clinical practice*, 67(1), 3–21.

Alcántar-Fernández, J., González-Maciel, A., Reynoso-Robles, R., Pérez Andrade, M. E., Hernández-Vázquez, A. J., Velázquez-Arellano, A., & Miranda-Ríos, J. (2019). High-glucose diets induce mitochondrial dysfunction in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 14(12), e0226652.

Angelo, G., & Van Gilst, M. R. (2009). Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science*, 326(5955), 954–958.

Angelo, G., & Van Gilst, M. R. (2009). Starvation protects germline stem cells and extends reproductive longevity in *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5955), 954–958.

Aronson, D. (2008). Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. In *Cardiovascular Diabetology: Clinical, Metabolic and Inflammatory Facets* (Vol. 45, pp. 1-16). Karger Publishers.

Ayyadevara, S., Alla, R., Thaden, J. J., & Shmookler Reis, R. J. (2008). Remarkable longevity and stress resistance of nematode PI3K-null mutants. *Aging cell*, 7(1), 13–22. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00348.x>

Barbiellini Amidei, C., Fayosse, A., Dumurgier, J., Machado-Fragua, M. D., Tabak, A. G., van Sloten, T., Kivimäki, M., Dugravot, A., Sabia, S., & Singh-Manoux, A. (2021). Association Between Age at Diabetes Onset and Subsequent Risk of Dementia. *JAMA*, 325(16), 1640–1649. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4001>

Bargmann CI, Thomas JH, Horvitz HR (1990) Chemosensory cell function in the behavior and development of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55: 529–538

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., & Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>

Biessels, G. J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C., & Scheltens, P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *The Lancet Neurology*, 5(1), 64–74.

Blatnik, M., Thorpe, S. R., & Baynes, J. W. (2008). Succination of proteins by fumarate: mechanism of inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126, 272–275. <https://doi.org/10.1196/annals.1433.047>

Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., & Silva, A. J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79(1), 59–68. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90400-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90400-6)

Burton, N. O., Riccio, C., Dallaire, A., Price, J., Jenkins, B., Koulman, A., & Miska, E. A. (2020). Cysteine synthases CYSL-1 and CYSL-2 mediate *C. elegans* heritable adaptation to *P. vranovensis* infection. *Nature communications*, 11(1), 1741. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15555-8>

Burton, N. O., Willis, A., Fisher, K., Braukmann, F., Price, J., Stevens, L., Baugh, L. R., Reinke, A., & Miska, E. A. (2021). Intergenerational adaptations to stress are evolutionarily conserved, stress-specific, and have deleterious trade-offs. *eLife*, 10, e73425.

C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2012–2018. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>

Cabreiro, F., & Gems, D. (2013). Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO molecular medicine*, 5(9), 1300–1310. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100972>

Camsari, C. et al. (2019) Transgenerational effects of periconception heavy metal administration on adipose weight and glucose homeostasis in mice at maturity. *Toxicol. Sci.* 168, 610–619

Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, 46(2), 326–342. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90109-8)

Catrina SB, Okamoto K, Pereira T, Brismar K, Poellinger L. Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1alpha protein stability and function. *Diabetes* (2004) 53:3226–32. doi: 10.2337/diabetes.53.12.3226

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2004). Prevalence of overweight and obesity among adults with diagnosed diabetes--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 53(45), 1066–1068.

Cerychova, R., & Pavlinkova, G. (2018). HIF-1, Metabolism, and Diabetes in the Embryonic and Adult Heart. *Frontiers in endocrinology*, 9, 460. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00460>

Chang, S., Johnston, R.J., Jr., and Hobert, O. (2003). A transcriptional regulatory cascade that controls left/right asymmetry in chemosensory neurons of *C. elegans*. *Genes Dev.* 17, 2123–2137.

Chatterjee, S., Peters, S. A., Woodward, M., Mejia Arango, S., Batty, G. D., Beckett, N., Beiser, A., Borenstein, A. R., Crane, P. K., Haan, M., Hassing, L. B., Hayden, K. M., Kiyohara, Y., Larson, E. B., Li, C. Y., Ninomiya, T., Ohara, T., Peters, R., Russ, T. C., Seshadri, S., ... Huxley, R. R. (2016). Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia. *Diabetes care*, 39(2), 300–307. <https://doi.org/10.2337/dc15-1588>

Cheng, G., Huang, C., Deng, H., & Wang, H. (2012). Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. *Internal medicine journal*, 42(5), 484–491. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2012.02758.x>

Choi S. S. (2011). High glucose diets shorten lifespan of *Caenorhabditis elegans* via ectopic apoptosis induction. *Nutrition research and practice*, 5(3), 214–218. <https://doi.org/10.4162/nrp.2011.5.3.214>

Christensen, A. A., & Gannon, M. (2019). The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Current diabetes reports*, 19(9), 81. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1196-4>

Colbert, H. A., & Bargmann, C. I. (1997). Environmental signals modulate olfactory acuity, discrimination, and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 4(2), 179–191. <https://doi.org/10.1101/lm.4.2.179>

Cook, S. J., Jarrell, T. A., Brittin, C. A., Wang, Y., Bloniarz, A. E., Yakovlev, M. A., Nguyen, K. C. Q., Tang, L. T., Bayer, E. A., Duerr, J. S., Bülow, H. E., Hobert, O., Hall, D. H., & Emmons, S. W. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*, *571*(7763), 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1352-7>

Coughlan, M. T., Thorburn, D. R., Penfold, S. A., Laskowski, A., Harcourt, B. E., Sourris, K. C., Tan, A. L., Fukami, K., Thallas-Bonke, V., Nawroth, P. P., Brownlee, M., Bierhaus, A., Cooper, M. E., & Forbes, J. M. (2009). RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, *20*(4), 742–752. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008050514>

D'Urso, A., & Brickner, J. H. (2017). Epigenetic transcriptional memory. *Current genetics*, *63*(3), 435–439. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0661-8>

den Heijer, T., Vermeer, S. E., van Dijk, E. J., Prins, N. D., Koudstaal, P. J., Hofman, A., & Breteler, M. M. (2003). Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures on brain MRI. *Diabetologia*, *46*(12), 1604–1610. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1235-0>

De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., ERCUMENT CICEK, A., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., et al. (2014). Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* *515*, 209-215. <https://doi.org/10.1038/nature13772>

Devanapally, S., Ravikumar, S., & Jose, A. M. (2015). Double-stranded RNA made in *C. elegans* neurons can enter the germline and cause transgenerational gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(7), 2133-2138.

Dew-Budd, K., Jarnigan, J., & Reed, L. K. (2016). Genetic and Sex-Specific Transgenerational Effects of a High Fat Diet in *Drosophila melanogaster*. *PloS one*, *11*(8), e0160857.

Diwan, A., & Tupe, R. (2016). Diabetes and complications: cellular signaling pathways, current understanding and targeted therapies. *Current drug targets*, *17*(11), 1309-1328.

Dunn, G.A. and Bale, T.L. (2011) Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology* *152*, 2228–2236

Eliezer, Y., Deshe, N., Hoch, L., Iwanir, S., Pritz, C. O., & Zaslaver, A. (2019). A memory circuit for coping with impending adversity. *Current Biology*, *29*(10), 1573-1583.

Feng, Y., Williams, B. G., Koumanov, F., Wolstenholme, A. J., & Holman, G. D. (2013). FGT-1 is the major glucose transporter in *C. elegans* and is central to aging pathways. *The Biochemical journal*, *456*(2), 219–229. <https://doi.org/10.1042/BJ20131101>

Feng, Y., Williams, B. G., Koumanov, F., Wolstenholme, A. J., & Holman, G. D. (2013). FGT-1 is the major glucose transporter in *C. elegans* and is central to aging pathways. *The Biochemical journal*, *456*(2), 219–229. <https://doi.org/10.1042/BJ20131101>

Friedman DB, Johnson TE (1988) A mutation in the age-1 gene in *Caenorhabditis elegans* lengthens life and reduces hermaphrodite fertility. *Genetics* *118*, 75–86.

Frolows, N., & Ashe, A. (2021). Small RNAs and chromatin in the multigenerational epigenetic landscape of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, *376*(1826), 20200112. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0112>

Fullston, T., Ohlsson Teague, E. M., Palmer, N. O., DeBlasio, M. J., Mitchell, M., Corbett, M., Print, C. G., Owens, J. A., & Lane, M. (2013). Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. *FASEB journal* :

official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 27(10), 4226–4243. <https://doi.org/10.1096/fj.12-224048>

Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>

Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>

Gallegos, D. A., Chan, U., Chen, L.-F. and West, A. E. (2018). Chromatin regulation of neuronal maturation and plasticity. *Trends Neurosci.* 41, 311-324.

Garrigues, J. M., Sidoli, S., Garcia, B. A., & Strome, S. (2015). Defining heterochromatin in *C. elegans* through genome-wide analysis of the heterochromatin protein 1 homolog HPL-2. *Genome research*, 25(1), 76–88. <https://doi.org/10.1101/gr.180489.114>

Gleissner CA, Galkina E, Nadler JL, Ley K. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech.* (2007) 4:131– 40. doi: 10.1016/j.ddmec.2007.12.005

Gold, S. M., Dziobek, I., Sweat, V., Tirsi, A., Rogers, K., Bruehl, H., ... & Convit, A. (2007). Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(4), 711-719.

Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, 128(4), 635-638.

Golden, J. W., & Riddle, D. L. (1984). The *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental effects of pheromone, food, and temperature. *Developmental biology*, 102(2), 368–378

Greer, E. L., Beese-Sims, S. E., Brookes, E., Spadafora, R., Zhu, Y., Rothbart, S. B., Aristizábal-Corrales, D., Chen, S., Badeaux, A. I., Jin, Q., Wang, W., Strahl, B. D., Colaiácovo, M. P., & Shi, Y. (2014). A histone methylation network regulates transgenerational epigenetic memory in *C. elegans*. *Cell reports*, 7(1), 113–126.

Greer, E. L., Maures, T. J., Ucar, D., Hauswirth, A. G., Mancini, E., Lim, J. P., Benayoun, B. A., Shi, Y., & Brunet, A. (2011). Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 479(7373), 365–371.

Gupta, S., Kim, S. Y., Artis, S., Molfese, D. L., Schumacher, A., Sweatt, J. D., Paylor, R. E., & Lubin, F. D. (2010). Histone methylation regulates memory formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(10), 3589–3599.

Gupta, S., Kim, S. Y., Artis, S., Molfese, D. L., Schumacher, A., Sweatt, J. D., Paylor, R. E., & Lubin, F. D. (2010). Histone methylation regulates memory formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(10), 3589–3599.

Gusarov, I., Pani, B., Gautier, L., Smolentseva, O., Eremina, S., Shamovsky, I., ... & Nudler, E. (2017). Glycogen controls *Caenorhabditis elegans* lifespan and resistance to oxidative stress. *Nature communications*, 8(1), 1-12.

Halban, P. A., Polonsky, K. S., Bowden, D. W., Hawkins, M. A., Ling, C., Mather, K. J., Powers, A. C., Rhodes, C. J., Sussel, L., & Weir, G. C. (2014).  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *The Journal*

of clinical endocrinology and metabolism, 99(6), 1983–1992.

<https://doi.org/10.1210/jc.2014-1425>

Hall, D. H., & Russell, R. L. (1991). The posterior nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: serial reconstruction of identified neurons and complete pattern of synaptic interactions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 11(1), 1–22. doi:10.1523/JNEUROSCI.11-01-00001.1991

Hansen, F., Pandolfo, P., Galland, F., Torres, F. V., Dutra, M. F., Batassini, C., Guerra, M. C., Leite, M. C., & Gonçalves, C. A. (2016). Methylglyoxal can mediate behavioral and neurochemical alterations in rat brain. *Physiology & behavior*, 164(Pt A), 93–101.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.046>

Hayden, M. R., & Tyagi, S. C. (2002). Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. *Jop*, 3(4), 86-108.

Heard, E., & Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. *Cell*, 157(1), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045>

Hedgecock, E.M. and Russell, R.L. (1975). Normal and mutant thermotaxis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4061-4065.

Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E., & Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature genetics*, 39(3), 311–318.

<https://doi.org/10.1038/ng1966>

Hilliard, M. A., Bergamasco, C., Arbucci, S., Plasterk, R. H., & Bazzicalupo, P. (2004). Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, 23(5), 1101-1111.

Hobert, O. (2010). The impact of whole genome sequencing on model system genetics: Get ready for the ride. *Genetics*, 184, 317-319.

Hobert, O. (2013). The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.161.1,

[http://www.wormbook.org\\_AbstractArticle](http://www.wormbook.org_AbstractArticle)

Hobert O. (2005) Specification of the nervous system. *WormBook*. doi: 10.1895/wormbook.1.12.1. PMID: 18050401; PMCID: PMC4781215.

Hobert O. (2014) Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*. doi: 10.1895/wormbook.1.12.2. PMID: 20891032; PMCID: PMC4791530.

Huang, X., Wang, F., Chen, W., Chen, Y., Wang, N., & von Maltzan, K. (2012). Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain research*, 1469, 82–91.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.06.011>

Hwang, A. B., & Lee, S. J. (2011). Regulation of life span by mitochondrial respiration: the HIF-1 and ROS connection. *Aging*, 3(3), 304–310.

Izenberg, A., Perkins, B. A., & Brill, V. (2015). Diabetic neuropathies. In *Seminars in neurology* (Vol. 35, No. 04, pp. 424-430). Thieme Medical Publishers.

Jakovcevski, M., Ruan, H., Shen, E. Y., Dincer, A., Javidfar, B., Ma, Q., Peter, C. J., Cheung, I., Mitchell, A. C., Jiang, Y., Lin, C. L., Pothula, V., Stewart, A. F., Ernst, P., Yao, W. D., & Akbarian, S. (2015). Neuronal Kmt2a/Mll1 histone methyltransferase is essential for prefrontal synaptic plasticity and working memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(13), 5097–5108.



Janelidze, S., Hertze, J., Nägga, K., Nilsson, K., Nilsson, C., Swedish BioFINDER Study Group, Wennström, M., van Westen, D., Blennow, K., Zetterberg, H., & Hansson, O. (2017). Increased blood-brain barrier permeability is associated with dementia and diabetes but not amyloid pathology or APOE genotype. *Neurobiology of aging*, 51, 104–112.

Jiang, H., Guo, R., & Powell-Coffman, J. A. (2001). The *Caenorhabditis elegans* hif-1 gene encodes a bHLH-PAS protein that is required for adaptation to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 7916–7921.

Jin, Y., Hoskins, R., and Horvitz, H.R. (1994). Control of type-D GABAergic neuron differentiation by *C. elegans* UNC-30 homeodomain protein. *Nature* 372, 780–783.

Kaati, G., Bygren, L. O., & Edvinsson, S. (2002). Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. *European journal of human genetics*, 10(11), 682-688.

Kahn C. R. (1994). Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43(8), 1066–1084. <https://doi.org/10.2337/diab.43.8.1066>

Kaletta T, Hengartner MO. (2016) Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*, 5(5):387-99.

Kamal, M., D'Amora, D. R., & Kubiseski, T. J. (2016). Loss of hif-1 promotes resistance to the exogenous mitochondrial stressor ethidium bromide in *Caenorhabditis elegans*. *BMC cell biology*, 17 Suppl 1(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s12860-016-0112-x>

Katz, M., & Shaham, S. (2019). Learning and Memory: Mind over Matter in *C. elegans*. *Current Biology*, 29(10), R365-R367.

Kauffman, A., Parsons, L., Stein, G., Wills, A., Kaletsky, R., & Murphy, C. (2011). *C. elegans* positive butanone learning, short-term, and long-term associative memory assays. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49), e2490.

Kawano, T., Ito, Y., Ishiguro, M., Takuwa, K., Nakajima, T., & Kimura, Y. (2000). Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and biophysical research communications*, 273(2), 431-436.

Ke, Q., & Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology*, 70(5), 1469–1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>

Kerimoglu, C., Agis-Balboa, R. C., Kranz, A., Stilling, R., Bahari-Javan, S., Benito-Garagorri, E., Halder, R., Burkhardt, S., Stewart, A. F., & Fischer, A. (2013). Histone-methyltransferase MLL2 (KMT2B) is required for memory formation in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(8), 3452–3464.

Kim, S. and Kaang, B.-K. (2017). Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Exp. Mol. Med.* 49, e281-e281.

Kimura, K. D., Fujita, K., & Katsura, I. (2010). Enhancement of odor avoidance regulated by dopamine signaling in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(48), 16365–16375. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6023-09.2010>

Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu and G. Ruvkun. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277 942–946.

Kingsley, S. F., Seo, Y., Allen, C., Ghanta, K. S., Finkel, S., & Tissenbaum, H. A. (2021). Bacterial processing of glucose modulates *C. elegans* lifespan and healthspan. *Scientific reports*, 11(1), 5931. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85046-3>

Könner, A. C., Hess, S., Tovar, S., Mesaros, A., Sánchez-Lasheras, C., Evers, N., Verhagen, L. A., Brönneke, H. S., Kleinridders, A., Hampel, B., Kloppenburg, P., & Brüning, J. C. (2011). Role for insulin signaling in catecholaminergic neurons in control of energy homeostasis. *Cell metabolism*, 13(6), 720–728.

Kouzarides T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

Lai, C. H., Chou, C. Y., Ch'ang, L. Y., Liu, C. S., & Lin, W. (2000). Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome research*, 10(5), 703–713. <https://doi.org/10.1101/gr.10.5.703>

Lakowski, B., & Hekimi, S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(22), 13091–13096. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13091>

Lang, B. T., Yan, Y., Dempsey, R. J., & Vemuganti, R. (2009). Impaired neurogenesis in adult type-2 diabetic rats. *Brain research*, 1258, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.026>

Lee, S. J., Murphy, C. T., & Kenyon, C. (2009). Glucose shortens the life span of *C. elegans* by downregulating DAF-16/FOXO activity and aquaporin gene expression. *Cell metabolism*, 10(5), 379-391.

Li, W., Prakash, R., Kelly-Cobbs, A. I., Ogbi, S., Kozak, A., El-Remessy, A. B., ... & Ergul, A. (2010). Adaptive cerebral neovascularization in a model of type 2 diabetes: relevance to focal cerebral ischemia. *Diabetes*, 59(1), 228-235.

Lin, C. H., Tomioka, M., Pereira, S., Sellings, L., Iino, Y., & van der Kooy, D. (2010). Insulin signaling plays a dual role in *Caenorhabditis elegans* memory acquisition and memory retrieval. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(23), 8001–8011. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4636-09.2010>

Lipinski B (2002). Evidence in support of a concept of reductive stress. *The British journal of nutrition*, 87: 93-94; discussion 94

Lu, Q. Y., Chen, W., Lu, L., Zheng, Z., & Xu, X. (2014). Involvement of RhoA/ROCK1 signaling pathway in hyperglycemia-induced microvascular endothelial dysfunction in diabetic retinopathy. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(10), 7268–7277.

Luo, X., Wu, J., Jing, S., & Yan, L. J. (2016). Hyperglycemic stress and carbon stress in diabetic glucotoxicity. *Aging and disease*, 7(1), 90.

Ma, D. K., Marchetto, M. C., Guo, J. U., Ming, G., Gage, F. H. and Song, H. (2010). Epigenetic choreographers of neurogenesis in the adult mammalian brain. *Nat. Neurosci.* 13, 1338.

Mäe, M. A., Li, T., Bertuzzi, G., Raschperger, E., Vanlandewijck, M., He, L., ... & Keller, A. (2018). Prolonged systemic hyperglycemia does not cause pericyte loss and permeability at the mouse blood-brain barrier. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.

Manikkam, M., Tracey, R., Guerrero-Bosagna, C., & Skinner, M. K. (2013). Plastics derived endocrine disruptors (BPA, DEHP and DBP) induce epigenetic transgenerational

inheritance of obesity, reproductive disease and sperm epimutations. *PloS one*, 8(1), e55387.

Manning G. (2005). Genomic overview of protein kinases. *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 1–19.

Mejia-Martinez, F., Franco-Juarez, B., Moreno-Arriola, E., Hernández-Vázquez, A., Martínez-Avila, M., Gómez-Manzo, S., Marcial-Quino, J., Carvajal, K., Velazquez-Arellano, A., & Ortega-Cuellar, D. (2017). The MXL-3/SBP-1 Axis Is Responsible for Glucose-Dependent Fat Accumulation in *C. elegans*. *Genes*, 8(11), 307.

<https://doi.org/10.3390/genes8110307>

Miller, D. L., Budde, M. W., & Roth, M. B. (2011). HIF-1 and SKN-1 coordinate the transcriptional response to hydrogen sulfide in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 6(9), e25476.

Nono M, Kishimoto S, Sato-Carlton A, Carlton PM, Nishida E, Uno M. Intestine-to-Germline Transmission of Epigenetic Information Intergenerationally Ensures Systemic Stress Resistance in *C. elegans*. (2020). *Cell Rep.* 10;30(10):3207-3217.e4

Nuttley, W. M., Harbinder, S., & van der Kooy, D. (2001). Regulation of distinct attractive and aversive mechanisms mediating benzaldehyde chemotaxis in *Caenorhabditis elegans*. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 8(3), 170–181.

<https://doi.org/10.1101/lm.36501>

O'Rourke, E. J., & Ruvkun, G. (2013). MXL-3 and HLH-30 transcriptionally link lipolysis and autophagy to nutrient availability. *Nature cell biology*, 15(6), 668–676. <https://doi.org/10.1038/ncb2741>

Ogg S and Ruvkun G (1998) The *C. elegans* PTEN homolog, DAF-18, acts in the insulin receptor-like metabolic signaling pathway. *Mol Cell* 2, 887-893

Olde, B., and McCombie, W.R. (1997). Molecular cloning and functional expression of a serotonin receptor from *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Neurosci.* 8, 53–62.

Oliveira RP, Porter Abate J, Dilks K et al (2009) Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* 8, 524- 541

Parida, L., Neogi, S., & Padmanabhan, V. (2014). Effect of temperature pre-exposure on the locomotion and chemotaxis of *C. elegans*. *PloS one*, 9(10), e111342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111342>

Pang, Y., Lin, S., Wright, C., Shen, J., Carter, K., Bhatt, A., & Fan, L. W. (2016). Intranasal insulin protects against substantia nigra dopaminergic neuronal loss and alleviates motor deficits induced by 6-OHDA in rats. *Neuroscience*, 318, 157–165.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.020>

Pérez-Taboada, I., Alberquilla, S., Martín, E. D., Anand, R., Vietti-Michelina, S., Tebeka, N. N., Cantley, J., Cragg, S. J., Moratalla, R., & Vallejo, M. (2020). Diabetes Causes Dysfunctional Dopamine Neurotransmission Favoring Nigrostriatal Degeneration in Mice. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 35(9), 1636–1648.

<https://doi.org/10.1002/mds.28124>

Pignatola, F. C., Desiderio, A., Mirra, P., Nigro, C., Perruolo, G., Ulianich, L., Formisano, P., Beguinot, F., Miele, C., Napoli, R., & Fiory, F. (2021). Diabetes and Cognitive Impairment: A Role for Glucotoxicity and Dopaminergic Dysfunction. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12366.

Posner, R., Toker, I. A., Antonova, O., Star, E., Anava, S., Azmon, E., ... & Rechavi, O. (2019). Neuronal small RNAs control behavior transgenerationally. *Cell*, 177(7), 1814-1826.



- Qi, L., Cornelis, M. C., Zhang, C., Van Dam, R. M., & Hu, F. B. (2009). Genetic predisposition, Western dietary pattern, and the risk of type 2 diabetes in men. *The American journal of clinical nutrition*, 89(5), 1453-1458.
- Queisser, M. A., Yao, D., Geisler, S., Hammes, H. P., Lochnit, G., Schleicher, E. D., Brownlee, M., & Preissner, K. T. (2010). Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal. *Diabetes*, 59(3), 670–678. <https://doi.org/10.2337/db08-1565>
- Quiros PM, Goyal A, Jha P, Auwerx J. Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017 Mar 2;7(1):47-54. doi: 10.1002/cpmo.21. PMID: 28252199; PMCID: PMC5335900.
- Rankin, C. H., Beck, C. D., & Chiba, C. M. (1990). *Caenorhabditis elegans*: a new model system for the study of learning and memory. *Behavioural brain research*, 37(1), 89-92.
- Rechavi, O., Houri-Ze'evi, L., Anava, S., Goh, W. S. S., Kerk, S. Y., Hannon, G. J., & Hobert, O. (2014). Starvation-induced transgenerational inheritance of small RNAs in *C. elegans*. *Cell*, 158(2), 277-287.
- Remy, J. J. (2010). Stable inheritance of an acquired behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 20(20), R877-R878.
- Robertson R. P. (1995). Antagonist: diabetes and insulin resistance--philosophy, science, and the multiplier hypothesis. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 125(5), 560–565.
- Schwartz-Orbach, L., Zhang, C., Sidoli, S., Amin, R., Kaur, D., Zhebrun, A., Ni, J., & Gu, S. G. (2020). *Caenorhabditis elegans* nuclear RNAi factor SET-32 deposits the transgenerational histone modification, H3K23me3. *eLife*, 9, e54309.
- Schwartz-Orbach, L., Zhang, C., Sidoli, S., Amin, R., Kaur, D., Zhebrun, A., Ni, J., & Gu, S. G. (2020). *Caenorhabditis elegans* nuclear RNAi factor SET-32 deposits the transgenerational histone modification, H3K23me3. *eLife*, 9, e54309. <https://doi.org/10.7554/eLife.54309>
- Semenza G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 3(10), 721–732. <https://doi.org/10.1038/nrc1187>
- Sengupta, P., Chou, J. H., & Bargmann, C. I. (1996). odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell*, 84(6), 899-909.
- Shen, E., Shulha, H., Weng, Z. and Akbarian, S. (2014). Regulation of histone H3K4 methylation in brain development and disease. *Phil. Trans. R. Soc. B* 369, 20130514.
- Sulston, J. E., Schierenberg, J. G. White, and J. N. Thomson. (1983). The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 100: 64-119.
- Sun, X., Chen, W. D., & Wang, Y. D. (2017). DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. *Frontiers in pharmacology*, 8, 548.
- Tataridas-Pallas N, Thompson MA, Howard A, Brown I, Ezcurra M, Wu Z, Silva IG, Saunter CD, Kuerten T, Weinkove D, Blackwell TK, Tullet JMA. Neuronal SKN-1B modulates nutritional signalling pathways and mitochondrial networks to control satiety. *PLoS Genet.* 2021 Mar 4;17(3):e1009358. doi: 10.1371/journal.pgen.1009358. PMID: 33661901; PMCID: PMC7932105.
- Tauffmanberger, A., & Parker, J. A. (2014). Heritable transmission of stress resistance by high dietary glucose in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, 10(5).

Teshiba, E., Miyahara, K., & Takeya, H. (2016). Glucose-induced abnormal egg-laying rate in *Caenorhabditis elegans*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(7), 1436-1439.

Towbin, B. D., González-Aguilera, C., Sack, R., Gaidatzis, D., Kalck, V., Meister, P., Askjaer, P., & Gasser, S. M. (2012). Step-wise methylation of histone H3K9 positions heterochromatin at the nuclear periphery. *Cell*, 150(5), 934–947.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.051>Zeller, P., Padeken, J., van Schendel, R., Kalck, V., Tijsterman, M., & Gasser, S. M. (2016). Histone H3K9 methylation is dispensable for *Caenorhabditis elegans* development but suppresses RNA:DNA hybrid-associated repeat instability. *Nature genetics*, 48(11), 1385–1395.

Troemel, E. R., J. H. Chou, N.D. Dwyer, H.A. Colbert, and C. I. Bargman. (1995). Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* 83: 207-218.

Troemel, E.R., Kimmel, B.E., and Bargmann, C.I. (1997). Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*. *Cell* 91, 161–169.

Uchida, O., Nakano, H., Koga, M., and Ohshima, Y. (2003). The *C. elegans* *che-1* gene encodes a zinc finger transcription factor required for specification of the ASE chemosensory neurons. *Development* 130, 1215–1224.

Umegaki H. (2014). Type 2 diabetes as a risk factor for cognitive impairment: current insights. *Clinical interventions in aging*, 9, 1011–1019. <https://doi.org/10.2147/CIA.S48926>

Uno, M., & Nishida, E. (2016). Lifespan-regulating genes in *C. elegans*. *NPJ aging and mechanisms of disease*, 2(1), 1-8.

van Otterdijk, S. D., & Michels, K. B. (2016). Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence?. *The FASEB Journal*, 30(7), 2457-2465.

Veras-Estévez, B. A., & Chapman, H. J. (2018). Strengthening national health priorities for Diabetes prevention and management. *MEDICC review*, 20, 5-5.

Wan, Q. L., Meng, X., Wang, C., Dai, W., Luo, Z., Yin, Z., Ju, Z., Fu, X., Yang, J., Ye, Q., Zhang, Z. H., & Zhou, Q. (2022). Histone H3K4me3 modification is a transgenerational epigenetic signal for lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications*, 13(1), 768. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28469-4>

Ward, S., Thomson, N., White, J. G., & Brenner, S. (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology*, 160(3), 313-337.

Webb, W. M., Sanchez, R. G., Perez, G., Butler, A. A., Hauser, R. M., Rich, M. C., O'Bierne, A. L., Jarome, T. J., & Lubin, F. D. (2017). Dynamic association of epigenetic H3K4me3 and DNA 5hmC marks in the dorsal hippocampus and anterior cingulate cortex following reactivation of a fear memory. *Neurobiology of learning and memory*, 142(Pt A), 66–78.

Wen, J. Y., Kumar, N., Morrison, G., Rambaldini, G., Runciman, S., Rousseau, J., & van der Kooy, D. (1997). Mutations that prevent associative learning in *C. elegans*. *Behavioral neuroscience*, 111(2), 354.

Wes, P. D., & Bargmann, C. I. (2001). *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons. *Nature*, 410(6829), 698–701. <https://doi.org/10.1038/3507058>

Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* (1993) 42:801–13.

Wilson, M. A., Iser, W. B., Son, T. G., Logie, A., Cabral-Costa, J. V., Mattson, M. P., & Camandola, S. (2017). *skn-1* is required for interneuron sensory integration and foraging behavior in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 12(5), e0176798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176798>

Wolff, S. P. (1993). Diabetes mellitus and free radicals: free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *British medical bulletin*, 49(3), 642-652.

Xue, M., Xu, W., Ou, Y. N., Cao, X. P., Tan, M. S., Tan, L., & Yu, J. T. (2019). Diabetes mellitus and risks of cognitive impairment and dementia: A systematic review and meta-analysis of 144 prospective studies. *Ageing research reviews*, 55, 100944. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100944>

Ye, L., Wang, F., & Yang, R. H. (2011). Diabetes impairs learning performance and affects the mitochondrial function of hippocampal pyramidal neurons. *Brain research*, 1411, 57-64.

Yeo E. J. (2019). Hypoxia and aging. *Experimental & molecular medicine*, 51(6), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0233-3>

Zarse, K., Schmeisser, S., Groth, M., Priebe, S., Beuster, G., Kuhlow, D., Guthke, R., Platzer, M., Kahn, C. R., & Ristow, M. (2012). Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal. *Cell metabolism*, 15(4), 451–465. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.02.013>

Zhang, S., Banerjee, D., & Kuhn, J. R. (2011). Isolation and culture of larval cells from *C. elegans*. *PloS one*, 6(4), e19505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019505>

Zhang, Y., Shao, Z., Zhai, Z., Shen, C., & Powell-Coffman, J. A. (2009). The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*. *PloS one*, 4(7), e6348.

Zhao, Y., & Garcia, B. A. (2015). Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9), a025064. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025064>

Zheng, H., Wu, J., Jin, Z., & Yan, L. J. (2016). Protein Modifications as Manifestations of Hyperglycemic Glucotoxicity in Diabetes and Its Complications. *Biochemistry insights*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.4137/BCI.S36141>