

La epigenética: una herramienta importante en la evaluación ambiental en Ecotoxicología

A epigenética: uma ferramenta importante na avaliação ambiental em Ecotoxicologia

Epigenetics: An Important Environmental Assessment Tool in Ecotoxicology

Elin Yohana Manrique Julio

MD, Candidata a doctora en Toxicología Ambiental. Universidad del Atlántico, Universidad de Cartagena. Grupo de Investigación Biotoxam.

Cita: Manrique Julio EY. La epigenética: una herramienta importante en la evaluación ambiental en Ecotoxicología. Rev. Salud ambient. 2025; 25(2):139-149.

Recibido: 19 de octubre de 2024. **Aceptado:** 13 de noviembre de 2025. **Publicado:** 13 de noviembre de 2025.

Autor para correspondencia: Elin Yohana Manrique Julio.
Correo e: emanriquej@unicartagena.edu.co

Financiación: sin financiación.

Declaración de conflicto de intereses: sin conflicto de intereses.

Resumen

Introducción: La epigenética investiga las relaciones causa-efecto entre factores ambientales específicos y las modificaciones epigenéticas que desencadenan respuestas adaptativas en las células.

Objetivo: Esta revisión examinó estudios que utilizaron los modelos biológicos *Lemna minor*, *Caenorhabditis elegans* y *Daphnia magna* expuestas a contaminantes ambientales, se discutieron los posibles mecanismos de modificaciones epigenéticas, su papel en la adaptación de los organismos, así como la incidencia de la herencia transgeneracional. Además, buscó identificar aquellas áreas donde la investigación era limitada o contradictoria desde una mirada crítica del potencial de los análisis epigenéticos como herramienta para biomonitordeo de la contaminación.

Metodología: Búsqueda en bases de datos, uso de términos MeSH, y los booleanos AND y OR, inclusión artículos de investigación y revisión publicados entre el año 2000 y 2024. **Resultados:** Las alteraciones epigenéticas incluida la metilación del ADN y los cambios en las histonas son consideradas posibles biomarcadores de exposición ambiental y podrían informar no sólo sobre la exposición química durante la vida del organismo, sino que también abarcarían la herencia epigenética transgeneracional.

Conclusión: Se requiere más investigación para poder utilizar potencialmente las marcas epigenéticas como biomarcadores de exposición a sustancias tóxicas y estudiar la adaptación de los organismos los cambios medioambientales.

Palabras clave: cambios epigenéticos; *Lemna minor*; *Caenorhabditis elegans*; *Daphnia magna*; herencia transgeneracional; contaminantes; epigenética.

Resumo

Introdução: A epigenética investiga as relações causa-efeito entre fatores ambientais específicos e as modificações epigenéticas que desencadeiam respostas adaptativas nas células.

Objetivo: Esta revisão analisou estudos que utilizaram os modelos biológicos *Lemna minor*, *Caenorhabditis elegans* e *Daphnia magna* expostas a contaminantes ambientais. Foram discutidos os possíveis mecanismos de modificações epigenéticas, o seu papel na adaptação dos organismos, bem como a incidência da herança transgeracional. Além disso, procurou identificar áreas onde a investigação é limitada ou contraditória, adotando uma perspectiva crítica sobre o potencial das análises epigenéticas como ferramenta para a biomonitorização da contaminação.

Metodologia: Pesquisa em bases de dados, utilizando termos MeSH e os operadores booleanos AND e OR, incluindo artigos de investigação e de revisão publicados entre 2000 e 2024. **Resultados:** As alterações epigenéticas, incluindo a metilação do ADN e as

modificações das histonas, são consideradas possíveis biomarcadores de exposição ambiental e podem informar não apenas sobre a exposição química ao longo da vida do organismo, mas também sobre a herança epigenética transgeracional.

Conclusão: É necessária mais investigação para que as marcas epigenéticas possam vir a ser utilizadas como biomarcadores de exposição a substâncias tóxicas e para estudar a adaptação dos organismos às alterações ambientais.

Palavras-chave: alterações epigenéticas; *Lemna minor*; *Caenorhabditis elegans*; *Daphnia magna*; herança transgeracional; contaminantes; epigenética.

Abstract

Introduction: Epigenetics researches the cause-and-effect relationships between specific environmental factors and the epigenetic modifications that trigger adaptive responses in cells.

Purpose: This review examines studies that used the biological models *Lemna minor*, *Caenorhabditis elegans*, and *Daphnia magna* exposed to environmental pollutants, and discusses the possible mechanisms of epigenetic modifications, their role in the adaptation of organisms, and the incidence of transgenerational inheritance. In addition, it aims to identify areas where research is limited or contradictory from a critical perspective on the potential of epigenetic analyses as pollution biomonitoring tools.

Methodology: Search in databases, use of MeSH terms and Boolean operators AND and OR, and inclusion of research and review articles published between 2000 and 2024.

Results: Epigenetic alterations, including DNA methylation and histone changes, are considered potential environmental exposure biomarkers and could not only provide information about chemical exposure during an organism's lifetime but would also cover transgenerational epigenetic inheritance. **Conclusion:** Further research is needed in order to potentially use epigenetic marks as biomarkers of exposure to toxic substances and to study how organisms adapt to environmental changes.

Keywords: epigenetic changes; *Lemna minor*; *Caenorhabditis elegans*; *Daphnia magna*; transgenerational inheritance; pollutants; epigenetics.

INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental ha sido identificada como un factor capaz de inducir alteraciones epigenéticas que modifican la expresión génica¹, la diferenciación celular, el desarrollo de tejidos y la susceptibilidad a diversas enfermedades^{2,3}. En los últimos años, ha surgido especial interés en los contaminantes emergentes (CE), como fármacos, plaguicidas, microplásticos y disruptores endocrinos debido a que la evidencia ha mostrado que pueden desencadenar cambios epigenéticos⁴ con efectos adversos tales como: alteración endocrina, mutagénesis, carcinogénesis, trastornos congénitos, entre otras enfermedades; por lo cual se ha estimulado el desarrollo de investigaciones para estudiar sus fuentes, toxicidad, estabilidad fisicoquímica, destino y alternativas de degradación, así como posibles vías epigenéticas implicadas en sus efectos biológicos^{5,6}.

En este contexto, las alteraciones epigenéticas son consideradas como posibles biomarcadores de exposición ambiental y podrían informar no solo sobre la exposición química durante la vida del organismo, sino que también abarcarían la herencia epigenética transgeneracional⁷. Entre los mecanismos más estudiados se encuentran la metilación del ADN, y la modificación postraduccional de las histonas (HPTM), que modulan la accesibilidad de la cromatina y la expresión génica. Estos procesos constituyen la base molecular de la respuesta

adaptativa frente a contaminantes y serán abordados en los apartados siguientes desde su papel en organismos modelo de ecotoxicología.

La metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos más conservados y mejor caracterizado en los tres dominios de la vida^{8,9}. El proceso implica la adición de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) al quinto átomo de carbono de la citosina (o al sexto átomo de nitrógeno de la adenina) mediante la acción de las ADN metiltransferasa (DNMT) que utilizan la S-adenosil -L -metionina (SAM) como donadora de grupos metilo. La metilación del ADN puede modificar la organización de la cromatina y, por ende, la accesibilidad del ADN a los factores de transcripción, favoreciendo el silenciamiento o la activación génica según el contexto regulatorio¹⁰.

En los organismos eucariotas, el ADN se encuentra empaquetado en cromatina cuya unidad estructural básica es el nucleosoma, formado por ADN enrollado alrededor de un octámero de histonas¹¹. Las colas N-terminales de estas histonas son altamente flexibles y susceptibles a múltiples a modificaciones HPTM^{11,12} como la acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, SUMOilación, ribosilación de ADP, deiminación e isomerización de prolina no covalente¹³, que alteran la compactación de la cromatina y modulan la expresión génica. Estas marcas pueden actuar de forma sinérgica o antagónica entre sí, generando combinaciones

específicas que determinan distintos estados de activación o represión transcripcional¹⁴.

Un ejemplo clásico es la acetilación de histonas en residuos de lisina descrita inicialmente *Saccharomyces cerevisiae* la cual promueve una cromatina más abierta y transcripcionalmente activa¹⁵. De manera complementaria, la metilación de las histonas en residuos de lisina o arginina, mediante las enzimas histona metiltransferasa (HMT), puede inducir tanto activación como represión génica, dependiendo del sitio y del grado de metilación¹⁶. Por su alta complejidad combinatoria, las HPTM representan uno de los sistemas de regulación más dinámicos y versátiles de epigenoma¹⁷.

En conjunto, la metilación del ADN y las modificaciones de histonas constituyen una red de control epigenético interdependiente, esencial para comprender cómo los contaminantes ambientales pueden modular la expresión génica y generar respuestas adaptativas o adversas en los organismos expuestos.

En los últimos años, los estudios realizados en invertebrados y plantas han mostrado la importancia de las marcas epigenéticas como predictores relevantes de la respuesta biológica frente a contaminantes ambientales, aportando nueva información sobre los cambios adaptativos que se inducen sobre las especies¹⁸⁻²¹.

En este contexto, la presente revisión se centró en estudiar los principales cambios epigenéticos que se han reportado en los modelos biológicos *Lemna minor*, *Caenorhabditis elegans* y *Daphnia magna* expuestas a contaminantes ambientales en estudios ecotoxicológicos y se discuten los mecanismos de modificación epigenética, su papel en la adaptación fisiológica y la posible transmisión transgeneracional. Además, se busca identificar aquellas áreas donde la evidencia científica es aún limitada o contradictoria, y se valora críticamente el potencial de los análisis epigenéticos como herramienta para biomonitoring de la contaminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó búsqueda de la literatura en las bases de datos *ScienceDirect*, *Medline-PubMed*, *Scielo*, *Scopus*, *Redalyc*, *Latindex*, complementada con otras fuentes académicas de acceso abierto. Se emplearon términos de búsqueda y vocabulario controlado MeSH, combinado con los operadores booleanos AND, OR, así como el operador literal (""). Las ecuaciones de búsqueda utilizadas fueron las siguientes: (1) *Epigenetic changes AND Caenorhabditis elegans AND exposure to contaminants [OR chemical exposure]*; (2)

Epigenetic changes AND Daphnia magna AND exposure to contaminants; (3) *Epigenetic changes AND Lemna minor [OR duckweed OR lenteja de agua] AND exposure to contaminants*. Se establecieron como criterios de inclusión los artículos de investigación y revisión publicados entre los años 2000 y 2024, redactados en inglés o español, con acceso abierto y texto completo disponible. Los criterios de exclusión fueron artículos duplicados, editoriales y cartas al editor. En total se identificaron 158 artículos; al aplicar los criterios finalmente se obtuvieron 36 artículos de *Daphnia magna*, 24 de *Lemna minor* y 29 de *Caenorhabditis elegans* para un total de 89 que, en su mayoría, conformaron la base teórica de esta revisión, conforme los objetivos propuestos.

RESULTADOS

La exposición a contaminantes ambientales y otros estresores pueden modificar de manera significativa el epigenoma de los organismos expuestos²². Estas alteraciones epigenéticas inducidas por el ambiente pueden persistir durante mucho tiempo; incluso después de eliminar el agente inicial, y en algunos casos transmitirse a generaciones posteriores mediante mecanismos de herencia epigenética transgeneracional^{17,23}. Aunque los mecanismos epigenéticos se han estudiado principalmente en vertebrados y en el contexto de la salud humana, en los últimos años se ha documentado una creciente evidencia en invertebrados y plantas que enfrentan diversos desafíos ambientales, revelando que las marcas epigenéticas pueden actuar como predictores sensibles de la respuesta biológica ante una amplia gama de sustancias químicas^{6,24}.

La capacidad que tienen los organismos para responder a factores estresantes ambientales, incluidos los contaminantes químicos, se sustenta en mecanismos que modulan la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN. Estos mecanismos actúan mediante la incorporación de marcas epigenéticas que modifican la accesibilidad cromatínica y, en consecuencia, los perfiles de transcripción. Entre dichas marcas, la metilación e hidroxilación de los sitios CpG son procesos centrales que modulan la transcripción génica en respuesta a la exposición ambiental²⁵⁻²⁷. La hidroximetilación, en particular, constituye una etapa intermedia de la desmetilación activa, asociada a la regulación dinámica del genoma frente al estrés químico. Los cambios de metilación del ADN es la marca epigenética más documentada y en este campo se han desarrollado herramientas técnicas para su estudio en organismos modelo no utilizados habitualmente y por lo cual representa la herramienta más prometedora para el desarrollo de biomarcadores en estudios ecotoxicológicos²⁸.

1. METILACIÓN DEL ADN

La metilación del ADN ocurre principalmente en los dinucleótidos CpG, y en los vertebrados esta modificación participa en el silenciamiento de las regiones genómicamente inactivas y la regulación de genes asociados a procesos de diferenciación y desarrollo^{29,30}. En los invertebrados y en organismos con genes parcialmente metilados, la metilación del cuerpo genómico (gbM) es la forma predominante de metilación CpG^{31,32}. Aunque su función no se comprende por completo, se plantea que contribuye a la estabilidad transcripcional y homeostasis génica, lo que podría conferir ventajas adaptativas frente a cambios ambientales³³. A pesar de la variabilidad, la maquinaria de metilación del ADN está relativamente conservada en varios organismos³⁴. Sin embargo, los niveles absolutos y los patrones de metilación del ADN pueden variar sustancialmente entre diferentes tejidos y etapas de desarrollo dentro de un organismo, entre especies, y puede ser modulado directamente por señales ambientales extrínsecas³⁵.

Hasta hace pocos años se pensaba que los genomas de los invertebrados en su mayoría estaban escasamente metilados³⁶; tal como, en el caso del *Caenorhabditis elegans*, *Daphnia magna* e insectos dípteros, y se creía que los niveles de metilación del ADN estaban completamente ausentes o muy bajos³⁷; pero, esto se debía a que no había sido posible replicar los experimentos que mostraron que la marca de 5-metil-Citosina (5mC) incrementaba en función del envejecimiento y que además carecen de homólogos funcionales de las metiltransferasas de ADN³⁸.

Por otra parte, los ensayos de plantas son muy sensibles a muchos contaminantes ambientales y se han

utilizado para monitorear los posibles efectos sinérgicos de mezclas de contaminantes por ejemplo la *Lemna minor*, puede acumular selectivamente ciertos químicos y puede servir como monitor biológico³⁹. Además, algunos estresores le inducen la hipermetilación del ADN en muchos contextos de citosina CG y CHG, pero no en CHH. Además, la metilación diferencial en el contexto de CHG, se puede detectar en un subconjunto de citosinas, incluso después de 3 a 12 generaciones de cultivo en un entorno común. Esto demuestra un efecto de memoria del estrés reflejado en el metiloma y que persiste a lo largo de múltiples generaciones clonales⁴⁰.

En el caso de plantas acuáticas como *Lemna minor*, se ha evidenciado una marcada hipermetilación en los contextos CG y CHG pero no en CHH, inducida por diversos estresores químicos³⁹. La metilación diferencial en el contexto de CHG, se puede detectar en un subconjunto de citosinas, incluso después de 3 a 12 generaciones de cultivo en un entorno común. Esto demuestra un efecto de memoria del estrés reflejado en el metiloma y que persiste a lo largo de múltiples generaciones clonales⁴⁰. Dicha característica convierte a *Lemna minor* en un bioindicador epigenético sensible, capaz de registrar exposiciones previas a contaminantes ambientales.

Finalmente, la secuenciación con bisulfito del genoma completo (WGBS), se considera la técnica estándar para la caracterización del metiloma, permitiendo mapear patrones de metilación con la resolución en estos modelos. Los resultados obtenidos con WGBS han demostrado variabilidad dependiendo del tipo de contaminante, su concentración y duración de la exposición consolidando esta técnica en una herramienta importante para evaluar los efectos epigenéticos en ecotoxicología (tabla 1).

Tabla 1. Niveles de metilación evaluados con bisulfito

Filo	Especie	% metilación	Referencia
Arthropoda	<i>Daphnia magna</i>	~0,85 (5mC)	(36)
Arthropoda	<i>Daphnia magna</i>	0,49 - 0,52 (5mC)	(37)
Arthropoda	<i>Daphnia magna</i>	0,1 - 0,81 (5mC) 0,22 - 0,44 (5mC)	(38)
Nematoda	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0,01 y 0,4 de las adeninas	(39)
Magnoliophyta	<i>Lemna minor</i>	CHH: 4,76 CHG: 30,43 (donde H puede ser adenina, citocina o timina)	(35)

2. MODIFICACIÓN DE LAS HISTONAS

Los modelos biológicos invertebrados como *Daphnia magna* y *Caenorhabditis elegans* ofrecen una herramienta excepcional para investigar el mecanismo y el papel de la epigenética en el ciclo de vida y el desarrollo. En *Caenorhabditis elegans* la modificación de la histona H3K4me3 ha sido identificada como una señal epigenética transgeneracional asociada a la regulación del metabolismo de los lípidos⁴¹.

Este nematodo presenta un sistema epigenético altamente conservado en todos los filos, los mecanismos de control transcripcional están bien descritos, incluidas modificaciones postraduccionales de la cola de histonas, proteínas remodeladoras de la cromatina y ARN no codificante. Aunque *Caenorhabditis elegans* no utiliza en gran medida la modificación covalente del ADN 5-metil-citosina⁴². Como modelo biológico el nematodo ha sido expuesto a múltiples xenobióticos tales como concentraciones de metil mercurio (MeHg), identificándose modificaciones en los patrones de trimetilación de la histona H3K4me3, un marcador de regiones transcripcionalmente activas, lo que evidencia un efecto tóxico a nivel epigenético después de una exposición crónica⁴³ lo cual proporcionó nuevos datos para ayudar a comprender los efectos tóxicos del MeHg a nivel molecular y a inferir que los contaminantes metálicos pueden inducir reprogramaciones epigenéticas heredables, incluso en organismos sin metilación de ADN detectable.

La *Daphnia magna* tiene características que pueden ser registradas con cierta facilidad como su tamaño corporal, ciclo de vida corto, alta fecundidad, y quizás lo más destacable por ser una respuesta clara ante condiciones adversas es su reproducción por partenogénesis cíclica⁴⁴. Estudios han mostrado que *Daphnia magna* posee homólogos de las metiltransferasas del ADN humano DNMT1, DNMT2 y DNMT3A parcialmente disponibles⁴⁵, y además una serie de modificaciones de las histonas H3 y H4 durante el desarrollo embrionario, en particular

la dimetilación de la histona H3K4me2 se distribuye de forma heterogénea en el núcleo de acuerdo con el ciclo celular⁴⁶, mientras que las modificaciones represoras como la histona H3K27me3, H3K9me y H4K20me2, se asocian a regiones de heterocromatina y están presentes de manera uniforme en todo el núcleo, la exposición a disruptores endocrinos y metales pesados se correlaciona con alteraciones en estos patrones, lo que sugiere un papel regulador en la plasticidad fenotípica y la reproducción partenogenética característica de esta especie^{2,47}.

La modificación de histonas en plantas está asociada con la modulación de genes que responden al estrés ambiental; constituyendo un mecanismo epigenético clave para la supervivencia a largo plazo⁴⁸.

Frente a estresores abióticos, los reguladores de la cromatina modulan redes de genes que permiten la adaptación a condiciones adversas y las modificaciones activadoras de las histonas, como la acetilación, la fosforilación y la ubiquitinación, favorecen la transcripción genética, mientras que la biotinilación y la SUMOIlación suprimen la expresión genética⁴⁹.

Uno de los casos de control epigenético mejor conocido en respuesta a cambios ambientales es la regulación de la floración inducida por frío, mediada por el complejo de activación de florígeros, cuyos componentes principales son la proteína florígen FLOWERING LOCUS T (FT) y la proteína del factor de transcripción FD⁵⁰. No se comprende bien cómo se regula este complejo a nivel molecular durante la floración de las lemnaceas⁴⁸.

No obstante, estudios recientes en especies del género *Lemnaceae*, mediante inmunotinción para la dimetilación de la histona H3K9me2, revelando una falta de señales fuertes de bloques heterocromáticos concentrados de ADN en estas plantas. Esta observación proporcionó información valiosa sobre la estructura de la cromatina y las modificaciones de las histonas presentes en las especies de *Lemnaceae*, lo que indica características únicas en su regulación epigenética^{51,52} (tabla 2).

Tabla 2. Modificación de las histonas

Filo	Especie	Histona	Referencia
Arthropoda	<i>Daphnia magna</i>	lisina 9 (H3K9me)	(2)
Arthropoda	<i>Daphnia magna</i>	lisina 4 (H3K4me2)	(52)
Arthropoda	<i>Daphnia magna</i>	lisina 27 (H3K27me3)	(53)
Arthropoda	<i>Caenorhabditis elegans</i>	lisina 4 (H3K4me3)	(47)
Arthropoda	<i>Caenorhabditis elegans</i>	lisina 4 (H3K4me3)	(49)
Magnoliophyta	<i>Lemna</i>	lisina 9 (H3K9me2)	(57, 58)

Tabla 3. Los Factores ambientales y contaminantes provocan cambios epigenéticos

Especie	Factor de exposición	Modificación generada	Referencia
<i>Daphnia magna</i>	Zinc	Disminución significativa en la metilación del ADN en la descendencia F1.	(51)
<i>Daphnia magna</i>	fungicida vinclozolina (VZ)	Reducción en la metilación global del ADN.	(63)
<i>Daphnia magna</i>	Cadmio (Cd), arsénico (As), plomo (Pb), NaCl, cianobacterias tóxicas	Metilación global del ADN, la exposición a la salinidad pueden afectar el nivel de metilación del ADN con potencial de herencia transgeneracional.	(37)
<i>Daphnia magna</i>	5-azacitina	Las exposiciones prenatales causaron cambios significativos en el metiloma de los genes diana (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2), en las etapas prenatales de <i>Daphnia</i> es susceptibles al mismo nivel de cambio que las etapas posnatales. Mientras que la combinación de exposiciones pre y posnatales provocó la reducción en la metilación del ADN. Algunos de los cambios en los patrones de metilación son persistentes incluso después de eliminar el factor estresante.	(64)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nanopartículas de AgNO ₃ , Ag-NP prístinas y su producto ambientalmente transformado, Ag-NP sulfidizado (sAg-NP)	La exposición multigeneracional a Ag-NP induce cambios epigenéticos que son heredados por la descendencia no expuesta. Los niveles de metilación de histonas en H3K4me2 aumentan en respuesta a la exposición prística a Ag-NP y no se recuperan después del rescate de la exposición. La exposición a las sAg-NP transformadas disminuyó significativamente los niveles de H3K4me2 y H3K9me3. La expresión de <i>spr-5</i> y <i>jmd-2</i> (desmetilasas H3K4me2 y H3K9me3, respectivamente) y <i>set-30</i> (metiltransferasa H3K4me2).	(65)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nanopoliestireno (PS-NP, 20)	La exposición a PS-NP de 20 nm resultó en una toxicidad transgeneracional grave. A una concentración de 100 µg/L, la toxicidad de las PS-NP de 20 nm en la locomoción y la reproducción se detectó en las generaciones F1-F6.	(66)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nanopartículas cobre (NP de CuO: 150 mg/L)	La exposición a nanopartículas cobre (NP de CuO: 150 mg/L) <i>reducen significativamente la longitud corporal de Caenorhabditis elegans</i> parental (P0). En ensayos transgeneracionales, la exposición de los padres a NP de CuO (150 mg/L) indujo significativamente toxicidad para el desarrollo y la reproducción en la progenie de <i>Caenorhabditis elegans</i> no expuesta (libre de NP de CuO) en la longitud corporal (F1) y el tamaño de la cría (F1 y F2), respectivamente.	(67)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Los microplásticos: poliamidas (PA), polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC) y partículas de poliestireno (PS)	La exposición a 5,0 mg m ⁻² de microplásticos durante 2 días inhibe significativamente las tasas de supervivencia, la longitud corporal y la reproducción de <i>C. elegans</i> , reduce los niveles de calcio y aumenta la expresión de la enzima glutatión-S-transferasa 4 en el intestino, lo que indica que el daño intestinal y el estrés oxidativo .	(68)
<i>Lemnaceas</i>	Toxinas fúngicas tetrapeptídicas cílicas, la apicidina (de <i>Fusarium</i> spp.) y la toxina HC (de <i>Cochliobolus carbonum</i>)	Afecta la actividad de la histona desacetilasa (HDAC).	(69)
<i>Lemnaceas</i>	Radionúclido ubicuo (uranio [U]) y un compuesto orgánico fluorado (ácido perfluorooctanoico [PFOA]), solos y en combinación. Los tratamientos fueron 0, 0,3 y 3 ppb de PFOA; 0, 0,5 y 5 ppb U; y combinaciones de estos.	En exposición única, hubo ligero efecto estimulante sobre el número de hojas con 0,3 ppb de PFOA, mientras que ambas concentraciones de U tuvieron un efecto perjudicial sobre el número de hojas. En doble exposición, las combinaciones con 5 ppb de U también tuvieron un efecto perjudicial sobre el número de hojas. Las concentraciones ambientalmente relevantes de PFOA y U tienen sólo efectos sutiles sobre el crecimiento y el estado de salud de <i>Lemna minor</i> .	(70)

Estos hallazgos aportan información relevante sobre la estructura de la cromatina y las particularidades de la regulación epigenética en estas plantas acuáticas, destacando su potencial como modelo para el estudio de la resiliencia epigenética vegetal frente a condiciones de estrés ambiental.

3. Los factores ambientales y contaminantes provocan cambios epigenéticos

En conjunto, la evidencia revisada demuestra que las modificaciones epigenéticas inducidas por señales ambientales desempeñan un papel clave en la variabilidad fenotípica y la adaptación ecológica de los organismos, con potencial herencia transgeneracional^{18,49}. Estas observaciones han dado origen al campo emergente de la ecotoxicología epigenética, que busca comprender cómo los factores estresantes químicos y físicos reconfiguran el epigenoma a través de metilación del ADN y modificaciones de histonas, utilizando modelos biológicos experimentales como plataforma de evaluación^{54,55}.

Para avanzar en este campo, es fundamental comprender los mecanismos moleculares subyacentes que explican cómo los factores ambientales se pueden alterar el epigenoma, ya que en ciertos casos estas modificaciones generan efectos perjudiciales sobre los fenotipos y pueden persistir durante mucho tiempo después eliminado el factor estresante, llegando a transmitirse a generaciones futuras^{22,56}. En este contexto, los estudios realizados con los modelos descritos han permitido identificar patrones epigenéticos comunes y respuestas específicas a distintos tipos de contaminantes, los cuales se resumen en la tabla 3.

4. Herencia de modificaciones epigenéticas

Las modificaciones epigenéticas pueden heredarse de tres formas: a) intergeneracional, cuando la exposición ambiental de los padres o durante la gestación afecta al embrión y su línea germinal (F1); b) multigeneracional, cuando varias generaciones están expuestas al mismo agente (F1 y F2); c) transgeneracional, cuando los efectos se manifiestan en descendientes que nunca estuvieron en contacto con el estresor original (F3 en adelante)⁵⁴.

Las modificaciones epigenéticas inducidas por el medio ambiente afectan los fenotipos del organismo y los de las generaciones posteriores al provocar cambios en la expresión genética. Este fenómeno proporciona un mecanismo útil para que la progenie se adapte al nuevo entorno⁵⁷. De tal manera que factores estresantes como los contaminantes ambientales ubicuos pueden inducir una respuesta defensiva adaptativa, y parecen tener amplios efectos en los fenotipos de las generaciones

futuras, incluso cuando los entornos estresantes ya no existen⁵⁸.

Es importante distinguir entre efecto transgeneracional epigenético y herencia transgeneracional epigenética. El primero es un término amplio que incorpora todos los fenotipos de las generaciones siguientes que no están determinados genéticamente⁵⁹.

Por lo tanto, la transferencia del fenotipo epigenético adquirido no se realiza a través de gametos y depende de la coherencia de las condiciones ambientales⁶⁰. Por el contrario, la herencia epigenética transgeneracional se basa en la herencia del fenotipo adquirido epigenéticamente a través de gametos. Esto requiere la persistencia de las marcas epigenéticas a través de los eventos de reprogramación⁶¹. También es importante comprender que la remetilación del ADN de las células germinales está influenciada por el microambiente proporcionado por las células somáticas circundantes y por las señales recibidas directamente del entorno. Como consecuencia, los factores ambientales pueden influir directa o indirectamente en la remetilación de las células germinales⁶¹.

La epigenética transgeneracional sigue siendo un campo bastante inexplorado. En *Daphnia magna* se han observado cambios epigenéticos en dos generaciones tras la exposición a compuestos ambientalmente relevantes⁶². La 5-azacitidina indujo una hipometilación del ADN en las generaciones F0, F1, y F2, incluso sin exposición directa crías de *Daphnia magna* F1 y F2 no expuestas directamente^{62,63}. Sin embargo, para confirmar la herencia transgeneracional, se requiere evidenciar efectos fenotípicos en la generación F3⁶⁴.

En concordancia con lo anterior, en *Daphnia* y otros invertebrados, la herencia transgeneracional solo puede confirmarse en la tercera generación no expuesta. La exposición ambiental de las hembras preñadas (F0) implica la exposición directa de su descendencia (F1) como de su línea germinal (F2); por ello, los verdaderos efectos heredables se evidencian únicamente en F3, libre del estresor original no expuesto^{65,66}.

En el estudio de exposición de *Daphnia magna* al cobre (Cu), se evidenció una posible herencia transgeneracional de hipometilación en genes de cadena ligera de dineína, particularmente en Dapma7bEVm630018t, lo que sugiere una transmisión estable de regiones diferencialmente metiladas en la línea germinal y diferentes patrones de respuesta según el historial de exposición al Cu⁶⁵.

En otro estudio, la exposición de *Daphnia magna* a nanopartículas de óxido de titanio (nTiO₂) durante cinco generaciones mostró efectos adversos persistentes

en descendientes criados en medios no expuestos, evidenciados por reducción del tamaño corporal y del rendimiento reproductivo⁶⁷.

Estos estudios sugieren que las modificaciones epigenéticas favorecen la adaptación de invertebrados y organismos de agua dulce expuestos a metales, lo que resalta la pertinencia de incorporar biomarcadores epigenéticos y su heredabilidad en los marcos de evaluación de riesgos y adaptación al cambio climático⁶⁸.

Otros estudios en larvas L3 de *Caenorhabditis elegans* expuestas a concentraciones ambientalmente de metales pesados han demostrado que la exposición parental puede potenciar los efectos tóxicos en generaciones posteriores, lo cual respalda la trasmisión epigenética de la respuesta a estos contaminantes. Por ejemplo, Yu et al, expusieron larvas L3 de *Caenorhabditis elegans* a metales acuosos (Cd, Cu, Pb y Zn) en concentraciones ambientalmente realistas durante 96 h. La descendencia, cultivada en condiciones no tóxicas, mostró inhibiciones del crecimiento y del comportamiento más severas que los progenitores con valores de CE₅₀ indicativos de efectos transgeneracionales más marcados, especialmente para el Cd⁶⁹.

En *Caenorhabditis elegans*, se comparó la toxicidad reproductiva transgeneracional inducida por nano poliestireno prístico (NPS) y NPS amino modificado (NPS-NH₂), encontrando que la exposición parental a NPS-NH₂ generó efectos más severos en la capacidad reproductiva (F1-F3) y el desarrollo gonadal (F1-F2), atribuidos a la apoptosis y a la disrupción molecular de la línea germinal⁷⁰.

En *Lemna minor*, al igual que en otros organismos, la herencia epigenética transgeneracional requiere alteraciones en la línea germinal. No obstante, en plantas de reproducción sexual la mayoría de los cambios de metilación se restablecen durante la gametogénesis, lo que limita la persistencia del estrés Epigenetic entre generaciones⁴⁰.

De manera similar, en *Arabidopsis thaliana* genéticamente idéntica, se observó que la exposición parental y F1 a estrés térmico moderado (30 °C) incrementó en cinco veces la producción de semillas. Esta mejora en la aptitud térmica se mantuvo en F3, incluso tras una generación (F2) en condiciones normales, evidenciando un fenómeno adaptativo epigenético y hereditario inducido por el ambiente⁷¹.

La reproducción asexual, al omitir las líneas germinales, puede favorecer la conservación prolongada de marcas epigenéticas. En *Lemna minor*, la rápida reproducción clonal ha demostrado una memoria de estrés térmico transgeneracional asociada con hipermetilación del

ADN en contextos CG y CHG, persistentes hasta 12 generaciones, lo que evidencia estabilidad epigenética a largo plazo⁴⁰.

DISCUSIÓN

1. DESAFÍOS EN ECOTOXICOLOGÍA

En la actualidad, las ciencias ambientales han incorporado los mecanismos epigenéticos como elementos esenciales para comprender la interacción gen-ambiente, la plasticidad fenotípica y las respuestas evolutivas ante el estrés ambiental^{57,68}.

En este contexto, los biomarcadores genéticos se reconocen como herramientas clave para la evaluación del riesgo frente a sustancias químicas²⁴. En particular las marcas de metilación del ADN (ADNm) emergen como indicadores moleculares prometedores, útiles tanto para definir los mecanismos de toxicidad y establecer umbrales de seguridad conservadores en una evaluaciones prospectivas, como para identificar exposiciones pasadas en evaluaciones retrospectivas, gracias a su alta especificidad, estabilidad y sensibilidad analítica⁷.

A pesar de las múltiples ventajas sobre las herramientas tradicionales existen muchos vacíos de conocimiento por lo cual se requiere más investigación para poder utilizar potencialmente las marcas epigenéticas como biomarcadores de exposición a sustancias tóxicas y estudiar la adaptación de los organismos los cambios medioambientales. De hecho, todos los estudios que se presentaron en esta revisión muestran el potencial de las marcas epigenéticas y como los contaminantes inducen el desarrollo de estas marcas, pero a pesar de esto no se utilizan de forma rutinaria porque aún deben abordarse aspectos como: la disponibilidad del genoma secuenciado para muchas especies de invertebrado, el cual aún no es accesible², los costos de WGBS pueden ser extremadamente altos⁷², es necesario vincular las modificaciones epigenéticas con patrones y fenotipos de expresión genética (plasticidad fenotípica y factores estresante)^{73,74}, enfocar inicialmente las exploraciones de modificaciones epigenéticas en especies ambientalmente relevantes para poder obtener información sobre las condiciones ambientales a las que estuvieron expuestos y las diferencias según las etapas de vida del animal⁷, es importante definir la herencia epigenética con especial atención a los efectos transgeneracionales debido a que son pocos los estudios ecotoxicológico que han examinado estos cambios y además las modificaciones fenotípicas epigenéticas pueden ser inducidas rápidamente por un factor ambiental estresante, pero pueden desaparecer una vez que el factor estresante se elimina dentro o entre generaciones⁷⁵, y finalmente es necesario identificar y caracterizar los mecanismos

epigenéticos como son las modificaciones de las histonas y los ARN no codificantes debido a que los en especies de invertebrados de uso en ecotoxicología son escasos⁷⁶.

2. CONCLUSIONES

Hoy día alteraciones epigenéticas son consideradas posibles biomarcadores de exposición ambiental y podrían informar sobre la exposición química durante la vida del organismo, y también abarcarían la herencia epigenética transgeneracional, por el cual el desarrollo de más investigación en modelos ecotoxicológicos promete avances de gran impacto que apuntan a los efectos a largo plazo de los contaminantes en los organismos vivos y su progenie y como estos enfrentan la carga de contaminación presente y pasada.

En este sentido los estudios de seguimiento a través de las generaciones podrían proporcionar información valiosa sobre la capacidad de adaptación de las especies y los mecanismos involucrados en sus respuestas a las transiciones de hábitat. Por lo cual además de los estudios sobre la metilación del ADN también es necesario comprender otros mecanismos como son las modificaciones de las histonas, entre otros que también ayudan a coordinar y regular la expresión de los genes a través de una red de interacciones interconectadas. Pero hoy día existen desafíos que se deben superar para poder utilizar marcas epigenéticas como biomarcadores de rutina; entre ellos la falta de disponibilidad del genoma, métodos costosos, dificultad para definir la herencia epigenética con especial atención a los efectos transgeneracionales, falta información relevante sobre las perturbaciones epigenéticas y los mecanismos de fondo, etc.

Pero se espera que muchos de los desafíos sean superados en los próximos años a medida que se haga más común el uso del recurso genéticos de organismos modelos y se puedan vincular las modificaciones epigenéticas con los cambios fenotípicas epigenéticas en esos organismos para comprender verdaderamente el impacto de dichas modificaciones en los organismos y su adaptación a las condiciones ambientales modificadas por los contaminantes y el cambio climático.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pankaj Chowdhary, Abhay Raj, Digvijay Verma YA. Environmental pollution: causes, effects, and the remedies. In: Elsevier, ed. *Microorganisms for Sustainable Environment and Health*. 2020.
2. Šrut M. Ecotoxicological epigenetics in invertebrates: Emerging tool for the evaluation of present and past pollution burden. *Chemosphere*. 2021; 282(June):1-14. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131026
3. Farsetti A, Illi B, Gaetano C. How epigenetics impacts on human diseases. *Eur J Intern Med*. 2023; 114(May):15-22.
4. Mukherjee S, Dasgupta S, Mishra PK, Chaudhury K. Air pollution-induced epigenetic changes: disease development and a possible link with hypersensitivity pneumonitis. *Environ Sci Pollut Res*. 2021; 28(40):55981-6002.
5. Ramírez-Malule H, Quiñones-Murillo DH, Manotas-Duque D. Emerging contaminants as global environmental hazards. A bibliometric analysis. *Emerg Contam*. 2020; 6:179-93.
6. Suarez-Ulloa V, Gonzalez-Romero R, Eirin-Lopez JM. Environmental epigenetics: A promising venue for developing next-generation pollution biomonitoring tools in marine invertebrates. *Mar Pollut Bull*. 2015; 98(1-2):5-13.
7. Mirbahai L, Chipman JK. Epigenetic memory of environmental organisms: A reflection of lifetime stressor exposures. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014; 764-765:10-7.
8. Jones PA. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012; 13(7):484-92.
9. Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*. 2010; 11(3):204-20.
10. Norouzitallab P, Baruah K, Bossier P, Vanrompay D. *Nonmammalian Model Organisms in Epigenetic Research*. Elsevier Inc.; 2019.
11. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997; 389(6648):251-60.
12. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011; 21(3):381-95.
13. Marques S, Outeiro TF. *Epigenetics: Development and Disease*. Vol 61.; 2013.
14. Jenuwein, Thomas, and Allis CD. Translating the Histone Code. *Sc*. 2001; 293(5532):1074-80.
15. Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, et al. Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 1996; 84(6):843-51.
16. Zhou VW, Goren A, Bernstein BE. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet*. 2011; 12(1):7-18.
17. Miller JL, Grant P. The Role of DNA Methylation and Histone Modifications in Transcriptional Regulation in Humans. *Subcell Biochem*. 2013; 61:289-317.
18. Aguilera O, Fernández AF, Muñoz A, Fraga MF. Epigenetics and environment: A complex relationship. *J Appl Physiol*. 2010; 109(1):243-51.
19. Athanasio CG, Sommer U, Viant MR, Chipman JK, Mirbahai L. Use of 5-azacytidine in a proof-of-concept study to evaluate the impact of pre-natal and post-natal exposures, as well as within generation persistent DNA methylation changes in Daphnia. *Ecotoxicology*. 2018; 27(5):556-68.
20. Ardura A, Clusa L, Zaiko A, Garcia-Vazquez E, Miralles L. Stress related epigenetic changes may explain opportunistic success in biological invasions in Antipode mussels. *Sci Rep*. 2018; 8(1):1-10.

21. Akcha F, Barranger A, Bachère E. Genotoxic and epigenetic effects of diuron in the Pacific oyster: in vitro evidence of interaction between DNA damage and DNA methylation. *Environ Sci Pollut Res.* 2021; 28(7):8266-80.
22. Weyrich A, Lenz D, Fickel J. Environmental change-dependent inherited epigenetic response. *Genes (Basel).* 2019; 10(1).
23. Flores KB, Wolschin F, Amdam G V. The role of methylation of DNA in environmental adaptation. *Integr Comp Biol.* 2013; 53(2):359-72.
24. Jeremias G, Gonçalves FJM, Pereira JL, Asselman J. Prospects for incorporation of epigenetic biomarkers in human health and environmental risk assessment of chemicals. *Biol Rev.* 2020; 95(3):822-46.
25. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 2002; 196(1):1-7.
26. Kriukiene E, Liutkevičiūtė Z, Klimašauskas S. 5-Hydroxymethylcytosine – the elusive epigenetic mark in mammalian DNA. *Chem Soc Rev.* 2012; 41(21):6916-30.
27. Xing TY DW. Recent advance in DNA epigenetic modifications- the sixth base in the genome. *Sheng li ke xue jin Zhan [Progreso en Fisiol.* 2012; 43(3):164-70.
28. Planques A, Kerner P, Ferry L, Grunau C, Gazave E, Vervoort M. DNA methylation atlas and machinery in the developing and regenerating annelid *Platynereis dumerilii*. *BMC Biol.* 2021; 19(1):1-26.
29. Assaf Zemach , Ivy E. McDaniel PS y DZ. Análisis evolutivo de todo el genoma de la metilación del ADN eucariótico. *Science (80-).* 2010; 328(5980):916-19.
30. Planques A, Kerner P, Ferry L, Grunau C, Gazave E, Vervoort M. DNA methylation during development and regeneration of the annelid *Platynereis dumerilii*. *bioRxiv.* Published online 2020:2020.11.13.381673.
31. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008;9(6):465-76.
32. Zemach A, Zilberman D. Evolution of eukaryotic DNA methylation and the pursuit of safer sex. *Curr Biol.* 2010; 20(17):R780-R785.
33. Zilberman D. An evolutionary case for functional gene body methylation in plants and animals. *Genome Biol.* 2017; 18(1):17-9.
34. Hernando-Herraez I, Heyn H, Fernandez-Callejo M, et al. The interplay between DNA methylation and sequence divergence in recent human evolution. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(17):8204-14.
35. Sven Bocklandt1, Wen Lin2, Mary E. Sehl3, Francisco J. Sa'ncchez1 5. Epigenetic Predictor of Age. *PlosOne.* 2012; 6(6):14821.
36. de Mendoza A, Lister R, Bogdanovic O. Evolution of DNA Methylome Diversity in Eukaryotes. *J Mol Biol.* 2020; 432(6):1687-705.
37. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature.* 2015; 517(7534):321-6.
38. Murillo de Ozores AR, Rodríguez-Aguilera JR. La N6-Metiladenina: Una Potencial Marca De Regulación Epigenética En Eucariontes. *Rev Educ Bioquímica.* 2016; 35(1):11-17.
39. Radić S, Stipanićev D, Cvjetko P, et al. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011; 74(2):182-7.
40. Van Antro M, Prelovsek S, Ivanovic S, et al. DNA methylation in clonal duckweed (*Lemna minor* L.) lineages reflects current and historical environmental exposures. *Mol Ecol.* 2023; 32(2):428-43.
41. Wan QL, Meng X, Wang C, et al. Histone H3K4me3 modification is a transgenerational epigenetic signal for lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun.* 2022; 13(1):1-14.
42. Skinner MK. *Caenorhabditis elegans* as an emerging model system in environmental epigenetics. *Environ Epigenetics.* 2018; 4(1):560-75.
43. Rudgalvyte M, Peltonen J, Lakso M, Wong G. Chronic MeHg exposure modifies the histone H3K4me3 epigenetic landscape in *Caenorhabditis elegans*. *Comp Biochem Physiol Part - C Toxicol Pharmacol.* 2017; 191:109-16.
44. Eads BD, Andrews J, Colbourne JK. Ecological genomics in *Daphnia*: Stress responses and environmental sex determination. *Heredity (Edinb).* 2008; 100(2):184-90.
45. Vandegehuchte MB, Kyndt T, Vanholme B, Haegeman A, Gheysen G, Janssen CR. Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. *Environ Int.* 2009; 35(4):700-6.
46. Robichaud NF, Sassine J, Beaton MJ, Lloyd VK. The Epigenetic Repertoire of *Daphnia magna* Includes Modified Histones . *Genet Res Int.* 2012; 2012:1-7.
47. Lindeman LC, Thaulow J, Song Y, et al. Epigenetic, transcriptional and phenotypic responses in two generations of *Daphnia magna* exposed to the DNA methylation inhibitor 5-azacytidine. *Environ Epigenetics.* 2019; 5(3):1-12.
48. Yoshida A, Taoka KI, Hosaka A, et al. Characterization of Frond and Flower Development and Identification of FT and FD Genes From Duckweed *Lemna aequinoctialis* Nd. *Front Plant Sci.* 2021; 12(October):1-14.
49. Dar FA, Mushtaq NU, Saleem S, Rehman RU, Dar TUH, Hakeem KR. Role of Epigenetics in Modulating Phenotypic Plasticity against Abiotic Stresses in Plants. *Int J Genomics.* 2022; 2022.
50. Tsuji H, Nakamura H, Taoka KI, Shimamoto K. Functional diversification of FD transcription factors in rice, components of florigen activation complexes. *Plant Cell Physiol.* 2013;54(3):385-97.
51. Harkess A, Bewick AJ, Lu Z, et al. The unusual predominance of maintenance DNA methylation in *Spirodela polyrhiza* . *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2024; (August 2023). doi:10.1093/g3journal/jkae004.
52. Cao HX, Vu GTH, Wang W, Messing J, Schubert I. Chromatin organisation in duckweed interphase nuclei in relation to the nuclear DNA content. *Plant Biol.* 2015; 17(s1):120-4.
53. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet.* 2012;13(2):97-109.
54. Norouzitallab P, Baruah K, Vanrompay D, Bossier P. Can epigenetics translate environmental cues into phenotypes? *Sci Total Environ.* 2019; 647:1281-1293.
55. J.M. Lynch, A. Wiseman FAAMDL. *Ecotoxicology.* (Levin SA, ed.). Elsevier; 2001.

56. Vandegehuchte MB, Janssen CR. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2014; 764-765:36-45.
57. Skinner MK. Environmental epigenetics and a unified theory of the molecular aspects of evolution: A neo-Lamarckian concept that facilitates neo-Darwinian evolution. *Genome Biol Evol.* 2015; 7(5):1296-302.
58. Kishimoto S, Uno M, Okabe E, Nono M, Nishida E. Environmental stresses induce transgenerationally inheritable survival advantages via germline-to-soma communication in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun.* 2017; 8:1-7.
59. Youngson NA, Whitelaw E. Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008; 9:233-57.
60. Reik W, Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: The battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet.* 2001; 27(3):255-6.
61. Matthew D, Anway, Cupp A. Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science (80-).* 2005; 308(5727):1466-9.
62. Vandegehuchte MB, Janssen CR. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology.* 2011; 20(3):607-24.
63. Vandegehuchte MB, Lemière F, Vanhaecke L, Vanden Berghe W, Janssen CR. Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comp Biochem Physiol - C Toxicol Pharmacol.* 2010; 151(3):278-85.
64. Harris KDM, Bartlett NJ, Lloyd VK. *Daphnia* as an Emerging Epigenetic Model Organism. *Genet Res Int.* 2012; 2012:1-8.
65. Jeremias G, Veloso T, Gonçalves FJM, Van Nieuwerburgh F, Pereira JL, Asselman J. Multigenerational DNA methylation responses to copper exposure in *Daphnia*: Potential targets for epigenetic biomarkers? *Chemosphere.* 2022; 308(P1):136231.
66. Bell AM, Stein LR. Transgenerational and developmental plasticity at the molecular level: Lessons from *Daphnia*. *Mol Ecol.* 2022; 26(19):4859-61.
67. Nederstigt TAP, Peijnenburg WJGM, Blom R, Vijver MG. Correlation analysis of single- and multigenerational endpoints in *Daphnia magna* toxicity tests: A case-study using TiO₂ nanoparticles. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2022; 241(June):113792.
68. Jeremias G, Barbosa J, Marques SM, Asselman J, Gonçalves FJM, Pereira JL. Synthesizing the role of epigenetics in the response and adaptation of species to climate change in freshwater ecosystems. *Mol Ecol.* 2018; 27(13):2790-806.
69. Yu ZY, Chen XX, Zhang J, Wang R, Yin DQ. Transgenerational effects of heavy metals on L3 larva of *Caenorhabditis elegans* with greater behavior and growth inhibitions in the progeny. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2013; 88:178-84.
70. Sun L, Liao K, Wang D. Comparison of transgenerational reproductive toxicity induced by pristine and amino modified nanoplastics in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Total Environ.* 2021; 768:144362.
71. Whittle CA, Otto SP, Johnston MO, Krochko JE. Adaptive epigenetic memory of ancestral temperature regime in *Arabidopsis thaliana*. *Botany.* 2009; 87(6):650-7.
72. Paun O, Verhoeven KJF, Richards CL. Opportunities and limitations of reduced representation bisulfite sequencing in plant ecological epigenomics. *New Phytol.* 2019; 221(2):738-42.
73. Hofmann GE. Ecological epigenetics in marine metazoans. *Front Mar Sci.* 2017; 4(JAN):1-7.
74. Noordhoek JW, Koning JT, Mariën J, et al. Exploring DNA methylation patterns in copper exposed *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus*. *Pedobiologia (Jena).* 2018; 66(September):52-7.
75. Burggren WW. Dynamics of epigenetic phenomena: Intergenerational and intragenerational phenotype "washout." *J Exp Biol.* 2015; 218(1):80-7.
76. Horemans N, Spurgeon DJ, Lecomte-Pradines C, et al. Current evidence for a role of epigenetic mechanisms in response to ionizing radiation in an ecotoxicological context. *Environ Pollut.* 2019; 251:469-83.