

Identificación de genes ABC en monogeenos de la familia *Ancyrocephalidae*: enfoque *in silico* y con microarreglos de ADN

Citlalic Altagracia Pimentel-Acosta^{1*}

 0000-0002-1854-7843

Daniel Toala-Franco²

 0000-0002-7797-1169

Víctor Hugo Caña Bozada³

 0000-0002-8982-8618

Emma Josefina Fájér-Ávila³

 0000-0003-3230-5709

Francisco Neptalí Morales-Serna¹

 0000-0002-2577-5369

¹ Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología/ Laboratorio de Parasitología Acuática, Mazatlán, México.

² Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí, Facultad de Ciencias del Mar, Manabí, Ecuador.

³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Mazatlán, México.

*Autor para correspondencia

Correo electrónico:

citlalic.pimentel@gmail.com

Resumen

La combinación de métodos moleculares es cada vez más eficiente para identificar genes en especies no modelo como los monogeenos. Estos organismos son parásitos que pueden causar problemas de salud en los peces en cautiverio o en condiciones de cultivo, por lo que es importante diseñar tratamientos efectivos que ataquen directamente los sistemas de defensa de los parásitos. Los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) son proteínas que participan en procesos de detoxificación de xenobióticos y en mecanismos de resistencia a fármacos. En monogeenos es escaso el conocimiento relacionado con los transportadores ABC. En el presente estudio se identificaron los genes putativos que codifican para proteínas ABC en dos especies de monogeenos, *Scutogyrus longicornis* y *Cichlidogyrus* spp., pertenecientes a la familia *Ancyrocephalidae*. Para esto se utilizaron datos transcriptómicos y microarreglos de ADN previamente publicados. Estas especies de monogeenos se encuentran comúnmente en cultivos de tilapia. En total, se predijeron 30 y 59 transportadores ABC en *S. longicornis* y *Cichlidogyrus* spp., respectivamente. Las subfamilias ABCB y ABCC fueron las más representadas. Ambas especies comparten 19 genes ABC, de los cuales *pgp-1*, *pgp-2*, *pgp-3*, *pgp-9*, *mrp-1*, *mrp-4*, *abce-1*, *abcf-2*, *wht-2* y *wht-8*, dados sus niveles de expresión relativamente más altos, probablemente son los de mayor importancia en procesos de detoxificación en los *Ancyrocephalidae*. Estos resultados podrían ser de utilidad para guiar futuros trabajos experimentales que busquen mejorar las estrategias de control de monogeenos en peces.

Palabras clave: Parásitos; Platyhelminthes; Transportadores ABC; Tilapia; Detoxificación.

Recibido: 2023-09-28

Aceptado: 2024-04-01

Publicado: 2024-11-05

Información y declaraciones adicionales en la página 13

© Derechos de autor 2024
Citlalic Altagracia Pimentel-Acosta et al.

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Cómo citar este artículo:

Pimentel-Acosta CA, Toala-Franco D, Caña Bozada VH, Fájér-Ávila EJ, Morales-Serna FN. Identificación de genes ABC en monogeenos de la familia *Ancyrocephalidae*: enfoque *in silico* y con microarreglos de ADN. Veterinaria Mexico OA. 2024;11. doi: 10.22201/fmvz.24486760e.2024.1273.

Contribución del estudio

Los monogeneos son helmintos parásitos que causan problemas de salud en peces de cultivo, por lo que se han implementado antihelmínticos que erradiquen su presencia. Sin embargo, no se ha logrado obtener productos 100 % efectivos. Los genes ABC participan en procesos de detoxificación de xenobióticos y pueden ser dianas farmacológicas para elaborar antihelmínticos efectivos contra los monogeneos. No obstante, la información de genes ABC en monogeneos es escasa, probablemente porque son especies no modelo. En este estudio aprovechamos información molecular disponible sobre dos especies de monogeneos y mediante la combinación de técnicas *in silico* y con microarreglos de ADN identificamos los principales genes ABC en dos especies de monogeneos de la familia *Ancyrocephalidae*. Nuestros resultados contribuyen a incrementar la información de genes ABC en monogeneos y puede ser el punto de partida para estudios enfocados en mejorar las estrategias de control de estos parásitos.

Introducción

Las técnicas moleculares han revolucionado el entendimiento de los procesos fisiológicos de los organismos. Para diversas especies cada vez hay más disponibilidad de genomas y transcriptomas, cuyo análisis nos aproxima a entender mejor los procesos biológicos complejos. La combinación de análisis *in silico* e *in vitro* puede ser de utilidad para guiar experimentos *in vivo* y de esta forma, reducir los costos de las investigaciones.^(1,2) Por ejemplo, en investigaciones médicas, el análisis de expresión génica de organismos sometidos a diferentes condiciones ha facilitado la identificación de genes y rutas metabólicas asociadas con la enfermedad o mecanismos de defensa, así como posibles dianas farmacológicas.^(3–6) Esta combinación de métodos también puede ser útil para la predicción de genes de importancia biológica en especies no modelo, en las cuáles se dificulta la obtención de muestras, como es el caso de los monogeneos.

Los monogeneos son helmintos parásitos, principalmente de organismos acuáticos, que comúnmente se encuentran en las branquias de los peces. Aunque la mayoría de las especies de monogeneos no son letales, algunas especies de las familias Gyrodactylidae, Dactylogyridae y Capsalidae han sido responsables de enfermedades y mortalidades en los cultivos de peces marinos.⁽⁷⁾ *Ancyrocephalidae* es otra familia de monogeneos de interés para el sector acuícola, ya que, aunque no se reconocen como letales, existen especies que llegan a causar daños tisulares como ruptura del epitelio branquial y vasos sanguíneos que provocan infiltración celular, hiperplasia lamelar e inflamación ocasionando anemia y problemas respiratorios en los peces cultivados en agua dulce, sobre todo en tilapia.^(8,9)

La tilapia es una de las principales especies de agua dulce cultivada en el mundo y es fuente de alimento e ingresos económicos para personas de comunidades rurales.⁽¹⁰⁾ México es de los principales productores de tilapia a nivel mundial, se producen alrededor de 169 mil toneladas anuales, de las cuales el 50 % proviene de cultivos a pequeña escala que contribuyen a la economía familiar y estabilidad social de regiones vulnerables en este país.⁽¹¹⁾ Los cultivos de tilapia en México no están libres de parásitos y los monogeneos de la familia *Ancyrocephalidae*, entre los que están *Cichlydogyrus* spp. y *Scutogyrus longicornis*, son bastante comunes.^(12–15)

La presencia de estos parásitos puede ocasionar problemas de salud en las tilapias y generar pérdidas económicas. En granjas de cultivo de tilapia en el sureste del país, se ha observado que la presencia de monogeneos *Cichlidogyrus* spp. y *Scutogyrus* spp. provoca anemia en juveniles de tilapias altamente infectados.⁽¹⁶⁾

Varios estudios se han enfocado a desarrollar antihelmínticos para erradicar a los monogeneos en los cultivos de peces; sin embargo, los métodos para determinar su eficacia son complicados debido a la inespecificidad de los compuestos. En ocasiones se encuentran compuestos efectivos para eliminar a los parásitos, pero afectan negativamente a los peces.⁽¹⁷⁾ Entonces, es importante seguir realizando investigaciones que permitan encontrar tratamientos seguros.

Para el desarrollo de tratamientos contra parásitos es importante conocer los mecanismos relacionados al metabolismo de xenobióticos, ya que están asociados con la capacidad de que un organismo sea más o menos tolerante a un fármaco.⁽¹⁸⁾ Los transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) son un grupo de proteínas involucradas en el metabolismo de xenobióticos. Estas proteínas, en eucariotas, transportan los xenobióticos desde el interior hacia el exterior de las células a través de las membranas celulares.^(18,19) Generalmente, los transportadores ABC presentan uno o dos dominios de unión a nucleótidos (NBD, por sus siglas en inglés) intracelulares y uno o dos dominios transmembranales (TMD, por sus siglas en inglés). El proceso de expulsión ocurre cuando los NBD, mediante actividad ATPasa, se unen e hidrolizan moléculas de ATP, lo cual produce un cambio conformacional en la proteína y permite el transporte de la molécula reclutada al exterior de la célula a través de los TMD.^(20,21)

Se han identificado *in silico* los genes que codifican para las proteínas ABC en más de 100 especies de helmintos, especialmente aquellos con importancia médica y veterinaria como los nemátodos, para los que hay información genómica disponible.⁽²¹⁾ Sin embargo, en el caso de los monogeneos sólo hay información genómica, transcriptómica o marcadores de secuencias expresadas para siete especies,⁽²²⁾ de las cuales solo cuatro han sido exploradas para identificar *in silico* genes ABC: *Gyrodactylus salaris* (32 ABC), *Protopolystoma xenopodis* (40 ABC), *Eudiplozoon nipponicum* (46 ABC) y *Neobenedenia melleni* (9 ABC).⁽²³⁾

Recientemente, nuestro grupo de trabajo generó el transcriptoma de *S. longicornis*,⁽²²⁾ que representa el segundo transcriptoma disponible para todos los monogeneos y el primero para la familia *Ancyrocephalidae*. Con base en este transcriptoma, el objetivo del presente estudio fue identificar *in silico* los transportadores ABC de *S. longicornis*. Adicionalmente, verificamos si los genes ABC de *S. longicornis* fueron expresados en los microarreglos heterólogos de monogeneos *Cichlidogyrus* obtenidos en un estudio previo.⁽²⁴⁾ Este enfoque es una aproximación para determinar cuáles son los principales transportadores ABC de la familia *Ancyrocephalidae*, y posiblemente otros monogeneos, que participan en la eliminación de xenobióticos.

Materiales y métodos

Declaratoria de ética

Para este estudio no se requirió aprobación del Comité de Ética institucional ya que no se utilizaron animales.

Identificación in silico de genes ABC en *Scutogyrus longicornis*

Las proteínas predichas a partir del transcriptoma de *S. longicornis* fueron descargadas desde el repositorio de datos de Mendeley.⁽²²⁾ Las proteínas predichas se alinearon contra los NBD de las proteínas ABC pertenecientes a dos especies modelo, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (InterPro IPR003439), utilizando BLASTp,⁽²⁵⁾ con e-value < 10⁻⁵. Las proteínas con aciertos se recuperaron y se analizaron con MOTIF Search (<https://www.genome.jp/tools/motif/MOTIF.html>) para determinar la topología de cada proteína (NBD y TMD) según los dominios de la base de datos Pfam.⁽²⁶⁾ Las secuencias de proteínas sin dominios se descartaron. Las proteínas que presentaron al menos un dominio se alinearon contra la base de datos de proteínas no redundantes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) utilizando NCBI BLASTp con parámetros predeterminados (e-value < 0.05), para clasificar las proteínas por subfamilia. De acuerdo a Sheps et al., los metazoarios pueden presentar ocho subfamilias de genes ABC (A-H).⁽²⁷⁾ Adicionalmente, los resultados de este alineamiento se usaron para identificar y descartar posibles secuencias contaminantes pertenecientes a bacterias o peces. Para descartar secuencias redundantes, la isoforma más larga para cada gen se extrajo usando el script auxiliar de Trinity "get_longest_isoform_seq_per_trinity_gene.pl".⁽²⁸⁾

La clasificación por subfamilia de los transportadores ABC de *S. longicornis* se confirmó mediante un análisis filogenético. Para ello, los dominios NBD se obtuvieron con PS-SCAN v1.86⁽²⁹⁾ utilizando el perfil Prosite PS50893. Las secuencias de dominio se alinearon utilizando MUSCLE v3.8.31⁽³⁰⁾ con parámetros predeterminados. Los gaps se recortaron con trimAL v1.4⁽³¹⁾ utilizando el modo automático (-automated1). Se utilizó el programa ModelFinder⁽³²⁾ para seleccionar los mejores modelos evolutivos, y IQ-TREE 1.6.12⁽³³⁾ para construir el árbol filogenético utilizando la prueba de radio de verosimilitud aproximada, que es similar a la prueba de Shimodaira-Hasegawa (1 000 repeticiones). El árbol se visualizó con el programa FigTree 1.4.4.⁽³⁴⁾

Identificación de genes ABC en microarreglos de *Cichlidogyrus spp.*

La obtención de los microarreglos heterólogos de *Cichlidogyrus spp.* se describe en el trabajo de Pimentel-Acosta et al., en el que se evaluó la toxicidad de nanopartículas de plata (AgNPs).⁽²⁴⁾ En ese trabajo, los parásitos *Cichlidogyrus* se obtuvieron de las branquias de tilapias cultivadas en granjas de Sinaloa. Estos parásitos fueron expuestos *in vitro* a una concentración baja (6 µg/L), y a una, alta (36 µg/L) de AgNPs. Después de una hora de exposición, los monogeneos se recolectaron, fijaron y preservaron en RNAlater seguido de la extracción de ARN con el Micro Kit RNeasy® Plus (QIAGEN). Se realizaron microarreglos heterólogos utilizando microarreglos con los 20 000 genes de una especie modelo, el nemátodo *C. elegans*. Los niveles de expresión de genes bajo cada concentración de AgNPs se calcularon estadísticamente utilizando el método de normalización y transformación Z (z-score).⁽³⁵⁾ Los perfiles de expresión de los microarreglos de *Cichlidogyrus spp.* en 6 µg/L y 36 µg/L de AgNPs se encuentran disponibles en <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/16/5889/s1>.

Para identificar la expresión de genes ABC en *Cichlidogyrus spp.*, se buscaron en los microarreglos los códigos de los 60 genes ABC reportados para

C. elegans,⁽²⁷⁾ así como los niveles de expresión (z-score) en las dos concentraciones de AgNPs (6 µg/L y 36 µg/L).

Homología y expresión diferencial de genes ABC entre *S. longicornis* y *Cichlidogyrus* spp.

Utilizando BLASTp se alinearon las secuencias de aminoácidos de los transportadores ABC obtenidos en el transcriptoma de *S. longicornis* contra las secuencias de aminoácidos de los genes heterólogos de *Cichlidogyrus* spp., los cuales son genes originalmente provenientes de *C. elegans*. Las secuencias heterólogas fueron descargadas desde NCBI. Los mejores resultados del alineamiento y con e-value < 10⁻⁵ fueron considerados como proteínas homólogas entre *S. longicornis* y *Cichlidogyrus* spp. Para determinar los genes que participan más activamente en procesos de detoxificación en los monogeneos se consideraron los transportadores ABC sobre y subexpresados con: $z - score \geq +1$ y ≥ -1 .

Resultados

El análisis de dominio, la búsqueda de homología y el análisis filogenético permitió identificar y clasificar 30 transportadores ABC en el transcriptoma de *S. longicornis*: 1 ABCA, 12 ABCB, 10 ABCC, 1 ABCE, 4 ABCF y 2 ABCG (Figura 1). No se encontraron miembros de las subfamilias ABCD y ABCH. La topología de cada proteína de acuerdo a sus dominios es presentada en Cuadro 1.

Los perfiles de expresión de los microarreglos contienen los valores de z-score para 19 539 genes en la concentración 6 µg/L y 19 472 genes con 36 µg/L de AgNPs, de los cuales 59 corresponden a genes ABC en *Cichlidogyrus* spp. (Cuadro 2), agrupados en las siguientes subfamilias; 7 genes ABCA, 23 genes ABCB, 9 genes ABCC, 5 genes ABCD, 1 gen ABCE, 3 genes ABCF, 9 genes ABCG y 2 genes ABCH. Solamente el gen *hmt-1* (W09D6.6) de *C. elegans* no se expresó en los monogeneos y el gen *pgp-3* (ZK455.7) se expresó sólo en los parásitos expuestos a la concentración más alta de AgNPs (36 µg/L). De los 59 genes ABC sólo 22 presentaron expresión diferencial significativa con valor z-score mayor o igual a 1 (Figura 2).

De los 30 transportadores predichos en el transcriptoma de *S. longicornis*, 19 fueron homólogos para genes ABC expresados en los microarreglos heterólogos de *Cichlidogyrus* spp. (Cuadro 3), de los cuales 10 presentaron expresión diferencial significativa con un z-score mayor o igual a 1 (Figura 2).

Discusión

En el presente estudio se identificaron los transportadores ABC putativos en monogeneos representantes de la familia Ancyrocephalidae, 30 transportadores ABC en *S. longicornis* y 59 en *Cichlidogyrus* spp. El número de transportadores ABC en *S. longicornis* es similar a los reportados en el genoma de *G. salaris* (32 ABC) posiblemente porque pertenecen a la misma subclase, Monopisthocotylea. Al contrario de otras especies de monogeneos de la subclase Polyopisthocotylea en los que el número de transportadores ABC es mayor, *P. xenopodis* (40 ABC) y *E. nipponicum* (46 ABC).⁽²³⁾

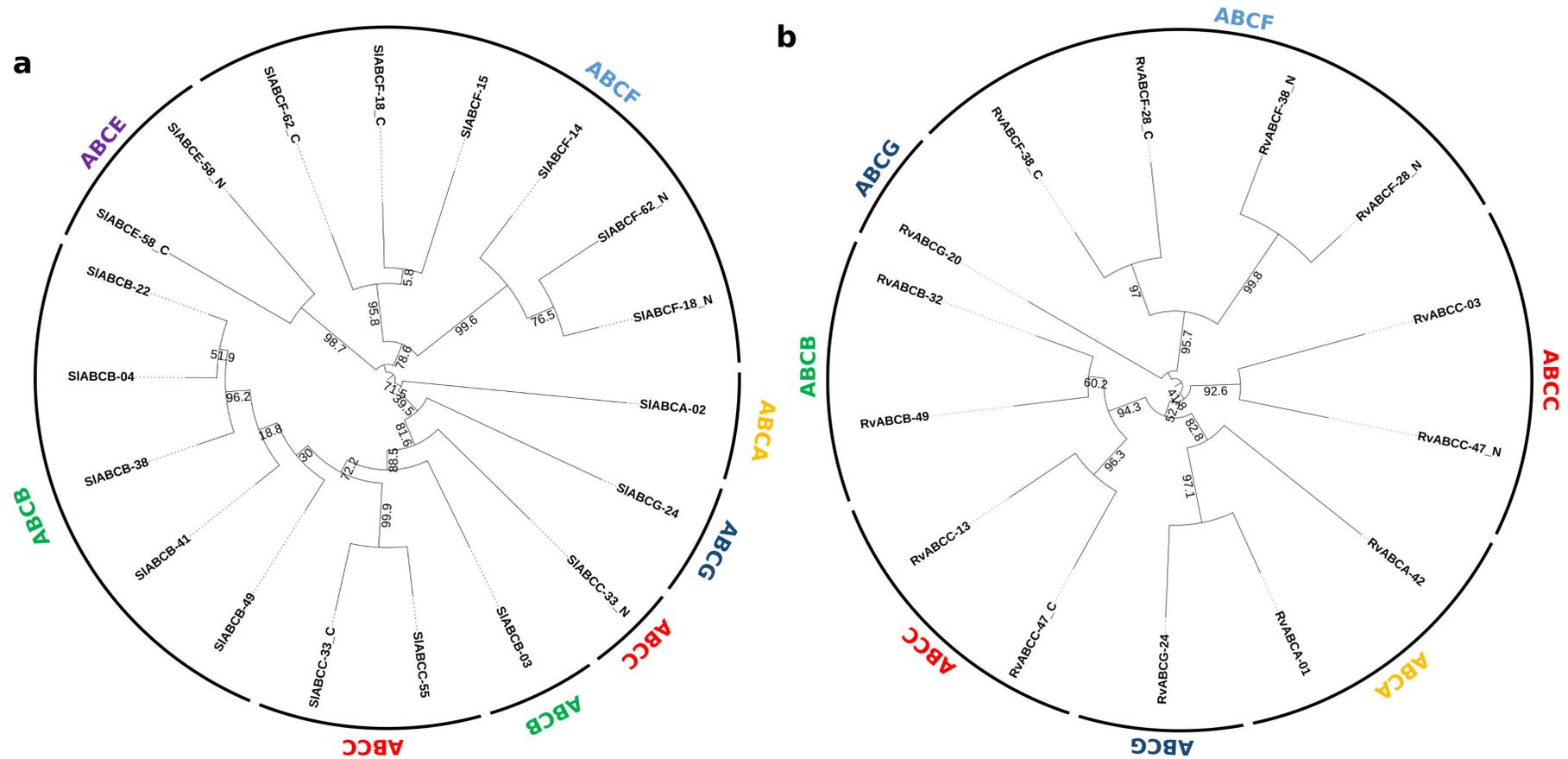


Figura 1. Árbol filogenético no enraizado de dominios NBD de proteínas ABC de *Scutogyrus longicornis*. Las diferentes subfamilias de proteínas ABC se encuentran indicadas en la figura. El modelo LG + I + G4 fue elegido. Los números en los nodos basales representan las frecuencias con las que se obtuvo la topología de árbol presentada con 1 000 iteraciones bootstrap. La barra de escala representa una sustitución de aminoácidos por sitio.

Cuadro 1. Genes ABC identificados *in silico* en el transcriptoma de *Scutogyrus longicornis*. ID. código identificador; Dominio. Topología de los dominios transmembranales (TMD) y los dominios de unión a nucleótidos (NBD) que se encuentran en los transportadores ABC.

| Sub-familia | ID <i>Scutogyrus longicornis</i> | ID en árbol | Dominios | ID del mejor alineamiento a secuencias NCBI | e-value |
|-------------|----------------------------------|-------------|-------------|---|-----------|
| A | DN1173_c0_g1_i1_g.29564 | SIABCA-02 | TMD-NBD | KAA3669979.1 | 4.00E-177 |
| B | DN13787_c0_g1_i1_g.67950 | SIABCB-04 | TMD | KAA0195735.1 | 1.00E-68 |
| B | DN20467_c0_g1_i1_g.61970 | SIABCB-17 | NBD | TPP58188.1 | 6.00E-21 |
| B | DN25_c0_g1_i2_g.15918 | SIABCB-22 | TMD-NBD | THD20367.1 | 2.00E-170 |
| B | DN4541_c0_g2_i2_g.852 | SIABCB-38 | TMD-NBD | KAA3680384.1 | 2.00E-148 |
| B | DN4924_c0_g2_i3_g.189 | SIABCB-45 | NBD | CDS30162.2 | 1.00E-29 |
| B | DN1018_c0_g1_i5_g.51207 | SIABCB-01 | TMD | AIJ28498.1 | 1.00E-51 |
| B | DN1516_c1_g4_i1_g.44166 | SIABCB-10 | NBD-TMD | THD21346.1 | 1.00E-37 |
| B | DN4541_c0_g3_i1_g.869 | SIABCB-41 | NBD | CDS15383.1 | 2.00E-118 |
| B | DN1215_c2_g1_i1_g.35156 | SIABCB-03 | TMD-NBD | XP_031341751.1 | 3.00E-123 |
| B | DN1566_c0_g2_i3_g.45160 | SIABCB-13 | TMD | KAF5397403.1 | 8.00E-103 |
| B | DN5305_c0_g2_i4_g.14196 | SIABCB-49 | NBD-TMD | CDS39599.2 | 9.00E-171 |
| B | DN13787_c0_g2_i1_g.67955 | SIABCB-06 | NBD-TMD | KAG5449322.1 | 4.00E-60 |
| C | DN14500_c0_g1_i1_g.26566 | SIABCC-09 | TMD | GAA49862.1 | 1.00E-21 |
| C | DN2689_c0_g1_i4_g.61338 | SIABCC-26 | TMD | THD26585.1 | 1.00E-17 |
| C | DN3269_c0_g2_i4_g.66293 | SIABCC-28 | TMD-NBD | THD25957.1 | 9.00E-125 |
| C | DN3269_c0_g4_i1_g.66285 | SIABCC-30 | TMD | THD25957.1 | 4.00E-37 |
| C | DN3711_c0_g2_i1_g.49339 | SIABCC-32 | TMD-NBD | GAA49862.1 | 3.00E-29 |
| C | DN9321_c0_g1_i1_g.19656 | SIABCC-61 | NBD | THD25957.1 | 2.00E-41 |
| C | DN181_c2_g1_i2_g.48169 | SIABCC-16 | NBD | CDS40693.1 | 5.00E-18 |
| C | DN3959_c1_g2_i1_g.57276 | SIABCC-35 | TMD | XP_018650283.1 | 1.00E-57 |
| C | DN3852_c0_g1_i2_g.65204 | SIABCC-33 | TMD-NBD | RTG86932.1 | 1.00E-162 |
| C | DN7784_c0_g1_i1_g.23933 | SIABCC-55 | NBD | KAA0187611.1 | 3.00E-91 |
| E | DN786_c1_g1_i3_g.58120 | SIABCE-58 | NBD | TNN16384.1 | 0 |
| F | DN252_c0_g1_i1_g.22598 | SIABCF-18 | NBD-NBD | KAF5405384.1 | 0 |
| F | DN1595_c0_g1_i4_g.44956 | SIABCF-14 | NBD | TNN09356.1 | 3.00E-156 |
| F | DN1595_c0_g2_i1_g.44958 | SIABCF-15 | NBD | CAX69408.1 | 1.00E-114 |
| F | DN957_c0_g1_i11_g.3992 | SIABCF-62 | NBD-NBD | THD27250.1 | 0 |
| G | DN2637_c0_g1_i3_g.61615 | SIABCG-24 | TMD-NBD-TMD | KAG5446220.1 | 0 |
| G | DN643_c0_g1_i18_g.70696 | SIABCG-52 | TMD-NBD | KAG5453675.1 | 7.00E-72 |

Cuadro 2. Genes ABC expresados en los microarreglos heterólogos de *Cichlidogyrus* spp.

| Sub-familia | ID Cspp | Símbolo genes putativos | AgNPs | | Sub-familia | ID Cspp | Símbolo genes putativos | AgNPs | | | | | |
|-------------|-----------|-------------------------|---------|---------|-------------|-----------|-------------------------|-----------|-----------|----------|--------|-------|-------|
| | | | 6 µg/L | 36 µg/L | | | | 6 µg/L | 36 µg/L | | | | |
| | | | z-score | z-score | | | | z-score | z-score | | | | |
| A | C24F3.5 | abt-1 | -0.34 | -0.12 | B | ZK484.2 | haf-9 | 0.51 | -0.45 | | | | |
| | C48B4.4 | ced-7 | -0.81 | 0.68 | | C | C18C4.2 | cft-1 | 1.68 | 1.67 | | | |
| | F12B6.1 | abt-2 | -0.3 | 0.18 | | | E03G2.2 | mrp-3 | 0.23 | -0.18 | | | |
| | F55G11.9 | abt-3 | 0.04 | -1.06 | | | F14F4.3 | mrp-5 | 0.99 | 0.81 | | | |
| | F56F4.6 | F56F4.6 | -0.32 | 0.34 | | | F20B6.3 | mrp-6 | 0.2 | 0.98 | | | |
| | Y39D8C.1 | abt-4 | -1.41 | -0.95 | | | F21G4.2 | mrp-4 | 4.27 | -0.93 | | | |
| | Y53C10A.9 | abt-5 | -0.43 | -0.53 | | | F57C12.4 | mrp-2 | 0.77 | 0.56 | | | |
| B | C05A9.1 | pgp-5 | -0.45 | 0.9 | D | | F57C12.5 | mrp-1 | -1.41 | 1.02 | | | |
| | C34G6.4 | pgp-2 | 0.61 | 1.8 | | Y43F8C.12 | mrp-7 | 0.77 | 0.3 | | | | |
| | C47A10.1 | pgp-9 | 1.28 | 0.87 | | Y75B8A.26 | mrp-8 | 0.07 | -0.94 | | | | |
| | C54D1.1 | pgp-10 | -0.17 | 0.61 | | C44B7.8 | pmp-1 | 0.33 | 0.24 | | | | |
| | DH11.3 | pgp-11 | 0.66 | 0.73 | | C44B7.9 | pmp-2 | -0.21 | -1.38 | | | | |
| | F22E10.1 | pgp-12 | -0.55 | -0.57 | | C54G10.3 | pmp-3 | -0.11 | -0.46 | | | | |
| | F22E10.2 | pgp-13 | -0.55 | 0.77 | | T02D1.5 | pmp-4 | 0.02 | -1.17 | | | | |
| | F22E10.3 | pgp-14 | 0.88 | 0.89 | | T10H9.5 | pmp-5 | -0.14 | -0.4 | | | | |
| | F22E10.4 | pgp-15 | 0.49 | 0.39 | | E | Y39E4B.1 | abce-1 | 1.22 | -0.9 | | | |
| | F42E11.1 | pgp-4 | -0.98 | 0.55 | | | F18E2.2 | abcf-1 | 0.76 | 0.37 | | | |
| | K08E7.9 | pgp-1 | -1.49 | 0.43 | | | F | F42A10.1 | abcf-3 | -0.08 | -0.14 | | |
| | T21E8.1 | pgp-6 | 0.12 | -0.55 | | | | T27E9.7 | bcf-2 | 0.87 | 1.89 | | |
| | T21E8.2 | pgp-7 | 0.01 | 0.52 | | | | C05D10.3 | wht-1 | -0.35 | -0.06 | | |
| | T21E8.3 | pgp-8 | 0.66 | -0.34 | | | | C10C6.5 | wht-2 | -1.02 | -0.6 | | |
| | ZK455.7 | pgp-3 | * | -1.27 | | | | C16C10.12 | wht-3 | -0.22 | 1.83 | | |
| | C30H6.6 | haf-1 | 0.5 | 0.32 | | | | F02E11.1 | wht-4 | 0.43 | 0.33 | | |
| | F43E2.4 | haf-2 | 0.92 | 0.18 | | | | G | F19B6.4 | wht-5 | 0.36 | 0.64 | |
| | F57A10.3 | haf-3 | 0.79 | -0.28 | | | | | T26A5.1 | wht-6 | 1.68 | -1.17 | |
| | W04C9.1 | haf-4 | -1.35 | -1.46 | | | | | Y42G9A.6 | wht-7 | 0.63 | 0.54 | |
| | W09D6.6 | haf-5 | * | * | | | | | Y47D3A.11 | wht-8 | 0.26 | 1.22 | |
| | Y48G8AL.1 | haf-6 | 1.71 | -0.19 | | | | | Y49E10.9 | Y49E10.9 | 0.36 | -0.05 | |
| | Y50E8A.16 | haf-7 | 1.18 | 1.43 | | | | | H | C56E6.1 | abcx-1 | -0.07 | -0.77 |
| | Y57G11C.1 | haf-8 | 2.59 | 1.57 | | | | | | C56E6.5 | abch-1 | -1.23 | -1.6 |

Los microarreglos fueron expuestos a AgNPs por una hora (+ sobreexpresados, subexpresados, * sin expresión). ID Cspp, identificadores de las secuencias de los genes heterólogos de *Cichlidogyrus* spp., los cuales son genes originalmente provenientes de *C. elegans*.

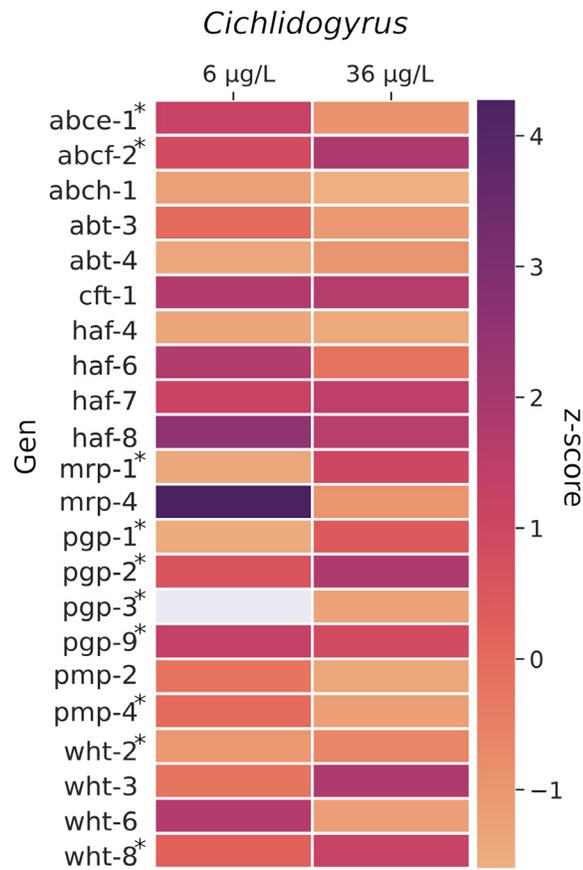


Figura 2. Genes ABC con expresión diferencial significativa, identificados en los microarreglos de *Cichlidogyrus* spp. Aquellos genes ABC con homólogos en *S. longicornis* son señalados con un asterisco (*).

Cuadro 3. Genes ABC compartidos entre *Scutogyrus longicornis* y *Cichlidogyrus* spp.

| ID SI | ID Csp | Símbolo genes putativos | % identidad | e-value |
|-----------|-----------|-------------------------|-------------|-----------|
| SIABCB-22 | K08E7.9 | pgp-1 | 36.833 | 4.69E-110 |
| SIABCB-17 | K08E7.9 | pgp-1 | 34.545 | 3.76E-14 |
| SIABCB-38 | C34G6.4 | pgp-2 | 36.056 | 7.62E-94 |
| SIABCB-10 | C34G6.4 | pgp-2 | 39.181 | 2.61E-31 |
| SIABCB-06 | C34G6.4 | pgp-2 | 37.582 | 1.12E-49 |
| SIABCB-04 | ZK455.7 | pgp-3 | 56.79 | 4.79E-53 |
| SIABCB-01 | C47A10.1 | pgp-9 | 29.771 | 7.74E-36 |
| SIABCB-41 | F22E10.2 | pgp-13 | 47.561 | 2.87E-96 |
| SIABCC-33 | F57C12.5 | mrp-1 | 34.742 | 2.36E-109 |
| SIABCC-32 | F57C12.5 | mrp-1 | 27.5 | 4.87E-14 |
| SIABCC-26 | F57C12.5 | mrp-1 | 24.893 | 4.98E-09 |
| SIABCC-55 | F21G4.2 | mrp-4 | 59.227 | 3.62E-87 |
| SIABCC-61 | F21G4.2 | mrp-4 | 44.8 | 6.78E-33 |
| SIABCC-16 | F14F4.3 | mrp-5 | 35.632 | 8.73E-09 |
| SIABCC-09 | F20B6.3 | mrp-6 | 36.735 | 6.71E-13 |
| SIABCC-30 | Y43F8C.12 | mrp-7 | 48.739 | 1.60E-30 |
| SIABCC-37 | Y43F8C.12 | mrp-7 | 26.316 | 5.62E-13 |
| SIABCC-35 | Y43F8C.12 | mrp-7 | 31.081 | 9.45E-29 |
| SIABCC-28 | Y75B8A.26 | mrp-8 | 26.027 | 9.16E-42 |
| SIABCF-18 | F18E2.2 | abcf-1 | 54.947 | 0 |
| SIABCF-14 | T27E9.7 | abcf-2 | 53.067 | 9.12E-117 |
| SIABCF-15 | T27E9.7 | abcf-2 | 59.912 | 4.34E-106 |
| SIABCF-62 | F42A10.1 | abcf-3 | 42.779 | 0 |
| SIABCE-58 | Y39E4B.1 | abce-1 | 66.113 | 0 |
| SIABCA-02 | F12B6.1 | abt-2 | 28.016 | 2.70E-94 |
| SIABCG-24 | Y47D3A.11 | wht-8 | 30.192 | 1.72E-80 |
| SIABCB-03 | F57A10.3 | haf-3 | 31.281 | 6.61E-77 |
| SIABCG-52 | C10C6.5 | wht-2 | 33.854 | 1.39E-26 |

El porcentaje de identidad y e-value provienen del alineamiento de secuencias de aminoácidos. ID SI, identificadores de las secuencias de *S. longicornis*; ID Csp, identificadores de las secuencias de los genes heterólogos de *Cichlidogyrus* spp., los cuales son genes originalmente provenientes de *C. elegans*.

Sin embargo, aunque *Cichlidogyrus* spp también pertenece a la subfamilia Monopisthocotylea, obtuvimos un número de transportadores ABC más alto probablemente por la técnica genómica utilizada, la hibridación de genes con microarreglos, la cual es muy sensible y puede detectar niveles de expresión muy bajos (z-score 0.01), pero en ocasiones estos genes pueden considerarse como falsos positivos.⁽³⁶⁾ De acuerdo a Wurmbach et al. a medida que decrecen los niveles de expresión, la tasa de falsos positivos puede incrementar.⁽³⁶⁾ También es posible que las muestras de *S. longicornis* y *Cichlidogyrus* spp. hayan estado contaminadas con ADN de sus hospederos y haber generado falsos positivos.

Aunque en el transcriptoma de *S. longicornis* fue posible hacer una filtración de secuencias a través herramientas bioinformáticas,⁽²²⁾ los resultados de microarreglos no permiten realizar este procedimiento. Otra posible explicación es que la exposición a AgNPs por la que pasaron los *Cichlidogyrus* spp. haya promovido la activación de más genes que en *S. longicornis*, cuyos especímenes no fueron expuestos a algún xenobiótico. Por tal motivo, los transportadores ABC homólogos entre *S. longicornis* y *Cichlidogyrus* spp se pueden considerar más certeros para estas especies de monogeneos de la familia Ancyrocephalidae.

Al igual que en el presente estudio, otras investigaciones también han encontrado que las subfamilias ABCB y ABCC son las que están mejor representadas en helmintos.^(21, 37) Posiblemente esto se debe a la capacidad de los transportadores ABCB o P-glicoproteínas (Pgp) y a los transportadores ABCC o genes MRP para expulsar de las células una gran diversidad de sustratos,⁽³⁸⁾ incluidos xenobióticos.⁽³⁹⁾ Aunque los genes Pgp y MRP tienen una alta similitud en la conformación de secuencias de aminoácidos, sólo difieren en un 15 %, ⁽⁴⁰⁾ se ha observado que estos transportadores se localizan en diferentes sitios. Por ejemplo, en la barrera hematoencefálica de humanos, los genes Pgp se expresan en las células endoteliales y astrocitos perivasculares mientras que los genes MRP en las células epiteliales del plexo coroideo, por lo que los transportadores ABC se complementan al actuar en distintos sitios de acción,⁽⁴¹⁾ por lo que es común que en perfiles de expresión se expresan al mismo tiempo transportadores ABCB y ABCC.

La identificación de 19 transportadores ABC putativos homólogos entre *S. longicornis* y *Cichlidogyrus* spp. sugiere la posibilidad de que estos transportadores son importantes en los procesos de detoxificación de los Ancyrocephalidae, particularmente los 10 genes ABC; *pgp-1* (-1.49), *pgp-2* (1.80), *pgp-3* (-1.27), *pgp-9* (1.28), *mrp-1* (-1.41), *mrp-4* (4.27), *abce-1* (1.22), *abcf-2* (1.89), *wht-2* (-1.02) y *wht-8* (1.22), que presentaron niveles de expresión relativamente más altos con z-score mayor o igual a 1. Las Pgp son un grupo importante de genes ABC que participan en mecanismos de detoxificación y están asociados con la resistencia de los parásitos a xenobióticos.^(21, 42)

Aquí confirmamos que en los monogeneos los Pgp también son de los genes más representativos al igual que en otros helmintos. En el nemátodo parásito *Parascaris univalens* se ha documentado la sobreexpresión de *pgp-2* y *pgp-9* en individuos expuestos a ivermectina, pirantel y tiabendazol.^(43, 44) De igual manera, en el nemátodo parásito *Haemonchus contortus*, Williamson et al. observaron la sobreexpresión de *pgp-2* y *pgp-9* en estudios de resistencia a múltiples fármacos.⁽⁴⁵⁾ Por otro lado, la subexpresión de los genes *pgp-1* (-1.49) en 6 µg/L AgNPs y el gen *pgp-3* (-1.27) en 36 µg/L AgNPs puede indicar la inactividad de los procesos

de detoxificación. Kaur y Dey observaron menor resistencia al verapamil en *Leishmania donovani* mediante la subexpresión de *pgp-1*.⁽⁴⁶⁾

Asimismo, Wartenberg et al. mencionan que la subexpresión de los genes *Pgp* está relacionada con el incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en las células, provocando estrés oxidativo y consecuentemente un daño a los organismos.⁽⁴⁷⁾ Esto coincide con los resultados de nuestro estudio previo, donde las AgNPs activaron mecanismos moleculares relacionados con la generación de ROS.⁽²⁴⁾ Probablemente, en el presente estudio, la subexpresión de genes *Pgp* está relacionada al estrés oxidativo causado por las AgNPs en los parásitos monogeenos.

Otro grupo de ABC importante en este estudio fueron los genes MRP. Previamente se observó que las AgNPs inducen a la activación de mecanismos de detoxificación por la sobreexpresión del gen *mrp-4* en los monogeenos expuestos a AgNPs (6 µg/L).⁽²⁴⁾ En el presente estudio confirmamos que *mrp-4* (4.27) fue el gen ABC más sobreexpresado con una marcada diferencia en los niveles de expresión. El *mrp-4* es un miembro de la subfamilia ABCC/MRP de los transportadores ABC, su principal función es expulsar compuestos endógenos y xenobióticos fuera de la célula para la protección celular. Estudios en diversos organismos han demostrado el aumento de la expresión de los MRP ante la exposición a fármacos.⁽⁴⁸⁾

En *C. elegans* se ha observado que *mrp-4* está involucrado en el transporte y almacenamiento de lípidos, pero también coinciden en el aumento de expresión en organismos resistentes a la ivermectina.⁽⁴⁹⁾ Además de *mrp-4*, se identificaron los genes *mrp-1*, *mrp-5*, *mrp-6*, *mrp-7* y *mrp-8* en *S. longicornis* y *Cichlidogyrus* spp., al igual que en otros helmintos como los nemátodos *C. elegans*, *Cooperia oncophora* y *H. contortus*, donde *mrp-1* se sobre expresó al ser expuestos a la ivermectina y el monopantel.⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾ James et al., sugieren que el incremento en la expresión de *mrp-1* está relacionado con el desarrollo de resistencia en el trematodo del hígado, *Fasciola* spp.⁽⁵²⁾

Conclusiones

El presente estudio expande la información actualmente disponible sobre la caracterización de genes ABC en parásitos de la familia Ancyrocephalidae, particularmente de las especies *S. longicornis* y *Cichlidogyrus* spp. Además, el trabajo evidenció la robustez de la metodología empleada (combinación de técnicas moleculares y análisis bioinformáticos), la cual permite realizar una mejor caracterización de los genes ABC en las especies bajo estudio, en relación con el empleo de una sola técnica.

Estos resultados pueden ser un punto de partida para predecir los principales genes ABC que actúan en la detoxificación de xenobióticos en otras especies de monogeenos. Sugerimos que los genes *pgp-1*, *pgp-2*, *pgp-3*, *pgp-9*, *mrp-1* y *mrp-4*, pueden ser importantes para futuros estudios relacionados con mejorar las estrategias de control de estos parásitos.

Disponibilidad de datos

Todos los datos relevantes se encuentran referenciados en el documento. Las proteínas predichas del transcriptoma de *Scutogyrus longicornis* se encuentran en el repositorio de datos Mendeley, doi: 10.17632/2wvwnwn4d7p.1. Los perfiles de expresión de los microarreglos de *Cichlidogyrus* spp. están disponibles en <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/16/5889/s1>.

Declaración de financiamiento

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, ahora Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), a través del proyecto FORDECYT 292474, otorgado a EJ Fájér-Ávila. El financiador no tuvo ningún papel en el diseño del estudio, la recopilación y análisis de datos, la decisión de publicar o la preparación del manuscrito. Durante esta investigación, VH Caña-Bozada y CA Pimentel-Acosta recibieron apoyo del CONAHCYT a través de becas Doctoral y Posdoctoral, respectivamente.

Conflicto de interés

Los autores no tienen ningún conflicto de intereses que declarar con respecto a esta publicación.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: FN Morales-Serna, CA Pimentel-Acosta.

Curado de datos: CA Pimentel-Acosta, VH Caña-Bozada, D Toala-Franco.

Análisis formal: CA Pimentel-Acosta, VH Caña-Bozada, D Toala-Franco.

Adquisición de fondos: EJ Fájér-Ávila, FN Morales-Serna.

Investigación: FN Morales-Serna, CA Pimentel-Acosta, VH Caña-Bozada.

Metodología: CA Pimentel-Acosta, VH Caña-Bozada.

Administración del proyecto: EJ Fájér-Ávila, FN Morales-Serna.

Recursos: EJ Fájér-Ávila, FN Morales-Serna.

Software: CA Pimentel-Acosta, VH Caña-Bozada, D Toala-Franco.

Supervisión: FN Morales-Serna

Visualización: CA Pimentel-Acosta, D Toala-Franco.

Escritura-borrador original: CA Pimentel-Acosta.

Escritura-revisión y edición: FN Morales-Serna, VH Caña-Bozada, D Toala-Franco, EJ Fájér-Ávila.

Referencias

1. Taylor K, Rego Alvarez L. Regulatory drivers in the last 20 years towards the use of *in silico* techniques as replacements to animal testing for cosmetic-related substances. *Computational Toxicology*. 2020;13:100112. doi: 10.1016/j.comtox.2019.100112.
2. Kashkooli FM, Soltani M, Souri M, Meaney C, Kohandel M. Nexus between *in silico* and *in vivo* models to enhance clinical translation of nanomedicine. *Nano Today*. 2021;36:101057. doi: 10.1016/j.nantod.2020.101057.
3. Shen D, Chang HR, Chen Z, et al. Loss of annexin A1 expression in human breast cancer detected by multiple high-throughput analyses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;326(1):218–227. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.214.

4. Wang XS, Zhang Z, Wang HC, et al. Rapid Identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(16):4851–4858. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0134.
5. Murray D, Doran P, MacMathuna P, Moss AC. *In silico* gene expression analysis – an overview. *Molecular Cancer*. 2007;6(1):50. doi: 10.1186/1476-4598-6-50.
6. Diep B, Barretto C, Portmann AC, et al. Salmonella serotyping; comparison of the traditional method to a microarray-based method and an *in silico* platform using whole genome sequencing data. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:2554. doi: 10.3389/fmicb.2019.02554.
7. Ogawa K. Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). *Parasitology*. 2015;142(1):178–195. doi: 10.1017/S0031182014000808.
8. Zhi T, Xu X, Chen J, et al. Expression of immune-related genes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after *Gyrodactylus cichlidarum* and *Cichlidogyrus sclerosus* infections demonstrating immunosuppression in coinfection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2018;80:397–404. doi: 10.1016/j.fsi.2018.05.060.
9. Igeh PC, Avenant–Oldewage A. Pathological effects of *Cichlidogyrus philander* Douëllou, 1993 (Monogenea, Ancyrocephalidae) on the gills of *Pseudocrenilabrus philander* (Weber, 1897) (Cichlidae). *Journal of Fish Diseases*. 2020;43(2):177–184. doi: 10.1111/jfd.13121.
10. Prabu E, Rajagopalsamy CBT, Ahilan B, Jeevagan IJMA, Renuhadevi M. Tilapia – an excellent candidate species for world aquaculture: a review. *ARRB*. 2019:1–14. doi: 10.9734/arb/2019/v3i1i330052.
11. Martínez-Cordeo FJ, Delgadillo TS, Sánchez-Zazueta E, Cai J. Tilapia aquaculture in Mexico - Assessment with a focus on social and economic performance. Vol. 12019. *FAO*; 2021. doi: 10.4060/cb3290en.
12. Paredes-Trujillo A, Velázquez-Abunader I, Torres-Irineo E, Romero D, Vidal-Martínez VM. Geographical distribution of protozoan and metazoan parasites of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) (Perciformes: Cichlidae) in Yucatán, México. *Parasites Vectors*. 2016;9(1):66. doi: 10.1186/s13071-016-1332-9.
13. Paredes-Trujillo A, Mendoza-Carranza M, Río-Rodríguez RED, Cerqueda-García D. Comparative assessment of metazoans infestation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (L.) (Perciformes: Cichlidae) in floating cages and ponds from Chiapas, Mexico. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2022;34:100757. doi: 10.1016/j.vprsr.2022.100757.
14. Morales-Serna FN, Medina-Guerrero RM, Pimentel-Acosta C, Ramírez-Tirado JH, Fajer-Ávila EJ. Parasite infections in farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in Sinaloa, Mexico. *Comparative Parasitology*. 2018;85(2):212–216. doi: 10.1654/1525-2647-85.2.212.
15. Osuna-Cabanillas JM, Medina-Guerrero RM, Camacho-Zepeda S, Morales-Serna FN, Fajer-Ávila EJ. Prevalencia e intensidad de tricodínidos y monogeneos en tilapia cultivada en el suroeste de México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 2022;9(2). doi: 10.19136/era.a9n2.3290.
16. Aguirre-Fey D, Benítez-Villa GE, Pérez-Ponce de León G, Rubio-Godoy M. Population dynamics of *Cichlidogyrus* spp. and *Scutogyrus* sp. (Monogenea) infecting farmed tilapia in Veracruz, México. *Aquaculture*. 2015;443:11–15. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.03.004.

17. Valladão GMR, Gallani SU, Pilarski F. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2015;38(5):417–428. doi: 10.1111/jvp.12202.
18. Matoušková P, Vokřál I, Lamka J, Skálová L. The role of xenobiotic-metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths. *Trends in Parasitology*. 2016;32(6):481–491. doi: 10.1016/j.pt.2016.02.004.
19. Abaza S. Recent advances in identification of potential drug targets and development of novel drugs in parasitic diseases. Part II: Parasite targets. *Parasitologists United Journal*. 2022;15(1):22–38. doi: 10.21608/PUJ.2022.129311.1160.
20. Mate L, Ballent M, Cantón C, et al. ABC-transporter gene expression in ivermectin-susceptible and resistant *Haemonchus contortus* isolates. *Veterinary Parasitology*. 2022;302:109647. doi: 10.1016/j.vetpar.2022.109647.
21. Langeland A, Jetter H, O'Halloran DM. The diversity of ABC transporter genes across the Phylum Nematoda. *Parasitology International*. 2021;83:102357. doi: 10.1016/j.parint.2021.102357.
22. Caña-Bozada V, Morales-Serna FN, Fajer-Ávila EJ, Llera-Herrera R. *De novo* transcriptome assembly and identification of G-Protein-Coupled-Receptors (GPCRs) in two species of monogenean parasites of fish. *Parasite*. 2022;29:51. doi: 10.1051/parasite/2022052.
23. Caña-Bozada V, Morales-Serna FN, García-Gasca A, Llera-Herrera R, Fajer-Ávila EJ. Genome-wide identification of ABC transporters in monogeneans. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2019;234:111234. doi: 10.1016/j.molbiopara.2019.111234.
24. Pimentel-Acosta CA, Ramírez-Salcedo J, Morales-Serna FN, et al. Molecular effects of silver nanoparticles on monogenean parasites: Lessons from *Caenorhabditis elegans*. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(16):5889. doi: 10.3390/ijms21165889.
25. Altschul S. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(17):3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
26. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D279–D285. doi: 10.1093/nar/gkv1344.
27. Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biology*. 2004;5(3):R15. doi: 10.1186/gb-2004-5-3-r15.
28. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*. 2011;29(7):644–652. doi: 10.1038/nbt.1883.
29. De Castro E, Sigrist CJA, Gattiker A, et al. ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(Web Server):W362–W365. doi: 10.1093/nar/gkl124.
30. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(5):1792–1797. doi: 10.1093/nar/gkh340.

31. Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. 2009;25(15):1972–1973. doi:10.1093/bioinformatics/btp348.
32. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 2017;14(6):587–589. doi:10.1038/nmeth.4285.
33. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 2015;32(1):268–274. doi:10.1093/molbev/msu300.
34. Rambaut, A. Figtree 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (accessed on 31 July 2020).
35. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using z score transformation. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2003;5(2):73–81. doi:10.1016/S1525-1578(10)60455-2.
36. Wurmbach E, Yuen T, Sealfon SC. Focused microarray analysis. *Methods*. 2003;31(4):306–316. doi:10.1016/S1046-2023(03)00161-0.
37. Cvilink V, Lamka J, Skálová L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug Metabolism Reviews*. 2009;41(1):8–26. doi:10.1080/03602530802602880.
38. McColl ER, Vassileva V, Piquette-Miller M. Drug Transporters: Efflux. In: *Comprehensive Pharmacology*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2022. pp. 608–626. doi:10.1016/B978-0-12-820472-6.00054-2.
39. Sepúlveda-Crespo D, Reguera RM, Rojo-Vázquez F, Balaña-Fouce R, Martínez-Valladares M. Drug discovery technologies: *Caenorhabditis elegans* as a model for anthelmintic therapeutics. *Medicinal Research Reviews*. 2020;40(5):1715–1753. doi:10.1002/med.21668.
40. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*. 2003;22(47):7537–7552. doi:10.1038/sj.onc.1206953.
41. Daood MJ, Ahdab-Barmada M, Watchko JF. Comparison of multidrug resistance protein-1 (MRP-1) and P-glycoprotein (PGP) expression in the developing human central nervous system: cellular and tissue localization. *Pediatric Research*. 2004;56(4):673–673. doi:10.1203/00006450-200410000-00062.
42. Kerboeuf D. P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003;22(3):332–346. doi:10.1016/S0924-8579(03)00221-8.
43. Gerhard AP, Krücken J, Heitlinger E, et al. The P-glycoprotein repertoire of the equine parasitic nematode *Parascaris univalens*. *Scientific Reports*. 2020;10(1):13586. doi:10.1038/s41598-020-70529-6.
44. Martin F, Dube F, Karlsson Lindsjö O, et al. Transcriptional responses in *Parascaris univalens* after in vitro exposure to ivermectin, pyrantel citrate and thiabendazole. *Parasites Vectors*. 2020;13(1):342. doi:10.1186/s13071-020-04212-0.
45. Williamson SM, Storey B, Howell S, Harper KM, Kaplan RM, Wolstenholme AJ. Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2011;180(2):99–105. doi:10.1016/j.molbiopara.2011.09.003.

46. Kaur J, Dey CS. Putative P-glycoprotein expression in arsenite-resistant *Leishmania donovani* down-regulated by verapamil. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;271(3):615–619. doi: 10.1006/bbrc.2000.2680.
47. Wartenberg M, Ling FC, Schallenberg M, et al. Down-regulation of Intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(20):17420–17428. doi: 10.1074/jbc.M100141200.
48. Russel F, Koenderink J, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2008;29(4):200–207. doi: 10.1016/j.tips.2008.01.006.
49. Yan R, Urdaneta-Marquez L, Keller K, James CE, Davey MW, Prichard RK. The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Veterinary Parasitology*. 2012;190(3–4):519–529. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.06.038.
50. Raza A, Bagnall NH, Jabbar A, Kopp SR, Kotze AC. Increased expression of ATP binding cassette transporter genes following exposure of *Haemonchus contortus* larvae to a high concentration of monepantel in vitro. *Parasites Vectors*. 2016;9(1). Art no 522. doi: 10.1186/s13071-016-1806-9.
51. Raza A, Kopp SR, Bagnall NH, Jabbar A, Kotze AC. Effects of in vitro exposure to ivermectin and levamisole on the expression patterns of ABC transporters in *Haemonchus contortus* larvae. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2016;6(2):103–115. doi: 10.1016/j.ijpddr.2016.03.001.
52. James CE, Hudson AL, Davey MW. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends in Parasitology*. 2009;25(7):328–335. doi: 10.1016/j.pt.2009.04.004.