



---

# Identificación de genes involucrados en la respuesta al selenio en *Ceanorhabditis elegans*

Sofía Zeballos

Laboratorio de Biología de Gusanos – IPMont

Marzo 2021

---

Tutor: Dr. Gustavo Salinas  
Co-tutora: Dra. Laura Romanelli

# Índice

---

<b>1</b>	<b>Introducción</b>	5
1.1	Selenio	5
1.1.1	Generalidades	5
1.1.2	Metabolismo	6
1.1.3	Selenio en la dieta	8
1.2	Selenio, selenocisteína y selenoproteínas	8
1.2.1	Comparación Sec vs Cys	9
1.2.2	Selenoproteínas	9
1.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	10
1.4	Lo que se conoce de genes involucrados en la respuesta a selenio	12
<b>2</b>	<b>Objetivos</b>	17
<b>3</b>	<b>Materiales y métodos</b>	17
3.1	Estirpes y reactivos utilizados	17
3.2	Manejo de estirpes	18
3.2.1	Medio de cultivo y alimento	18
3.2.2	Sincronización	18
3.2.3	Congelado	19
3.2.4	Generación de machos	19
3.3	Ensayo de toxicidad en medio líquido usando <i>WMicrotracker</i>	19
3.4	Resistencia a Se en placa	20
3.5	Ensayo de desarrollo post-embrionario	20
3.6	Cuantificación de embriones en útero	20
3.7	Observación de estirpes en microscopio	21
3.8	PCR y secuenciación	21
3.8.1	Extracción de ADN	21
3.8.2	PCR	21
3.8.3	Purificación de ADN amplificado por electroforesis en gel de agarosa y determinación de la concentración	21
3.8.4	Secuenciación	22
3.9	Modo de herencia y complementación	22

3.9.1	Cruce para determinar modo de herencia.....	22
3.9.2	Ensayo de complementación .....	22
3.9.3	Tratamiento estadístico .....	22
<b>4</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>24</b>
4.1	Caracterización de estirpes mutantes QW1267 y QW1270 resistentes a selenio .....	24
4.1.1	Determinación de la resistencia a selenito de sodio en medio líquido de las estirpes QW1270 y QW1267 .....	24
4.1.2	Amplificación y secuenciación de <i>egl-9</i> .....	25
4.1.3	Estudio del desarrollo post-embrionario de la estirpe QW1270 .....	27
4.1.4	Cuantificación de embriones en útero de la estirpe QW1270. ....	28
4.1.5	Visualización de retención de embriones en útero de la estirpe QW1270 .....	29
4.1.6	Estudio de complementación de QW1270 con una estirpe conocida mutante en <i>egl-9</i> ... ..	32
4.2	Estudio de resistencia a selenito de sodio en medio líquido de una estirpe mutante <i>knock-out</i> en <i>skn-1</i> .....	35
<b>5</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>37</b>
5.1	Caracterización de estirpes resistentes a Se.....	37
5.2	Estudio de la respuesta a Se de una estirpe mutante en el gen <i>skn-1</i> .....	40
<b>6</b>	<b>Anexo</b> .....	<b>48</b>

## Abreviaturas

---

ATP	Adenosín trifosfato
CH <sub>3</sub> SeH	Metil-selenol
Cys	Cisteína
ENU	N-ethyl-N.nitrosourea
GPX	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSSeSH	Selenodiglutación
H <sub>2</sub> S	Sulfuro de hidrógeno
H <sub>2</sub> Se	Selenuro de hidrógeno
HCN	Ácido cianhídrico
HIF	Factor de respuesta a hipoxia
Met	Metionina
N2	Estirpe Bristol – N2 (salvaje de <i>C. elegans</i> )
ODDD	Dominio de Degradación Oxígeno Dependiente de HIF
PHD	Dominio prolil-hidroxilasa
Se	Selenio
Sec	Selenocisteína
SeMet	Selenometionina
TRX	Tiorredoxina
TRXR	Tiorredoxina reductasa
VHL	Proteína <i>Von Hippel-Lindau Tumor Supressor</i>
αKG	2-oxoglutarato

## 1 Introducción

---

### 1.1 Selenio

#### 1.1.1 Generalidades

El selenio (Se) es un elemento no metálico que se encuentra en el grupo 16 de la tabla periódica. Fue descubierto en 1817 por Jöns Jacob Berzelius y posteriormente asignado como micronutriente en la década de 1950. Su rol biológico deriva de las selenoproteínas. Éstas contienen el 21er aminoácido, la selenocisteína (Sec), la cual se diferencia de la cisteína (Cys) por la sustitución de azufre por selenio [1].

Como oligoelemento, el requerimiento nutricional de selenio se encuentra en un intervalo acotado entre las cantidades necesarias por día y las concentraciones tóxicas de consumo. En el caso de seres humanos adultos, el mínimo es de 55 µg/día y el máximo de 400 µg/día [2]. Se han descrito patologías asociadas a deficiencias en la ingesta de selenio a largo plazo, dentro de las cuales se incluye el deterioro de la función inmune, la distinguida progresión de algunas infecciones virales, la maduración de espermatozoides, degeneraciones neuronales asociadas a estrés y el estado anímico, alteraciones en la concentración de las hormonas tiroideas T3 y T4, enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otros [3] [4]. Por otro lado, una de las primeras y más caracterizadas selenoproteínas es la glutatión peroxidasa (GPX) [5]. Esta enzima lleva a cabo la catálisis de reacciones de óxido-reducción que convierten peróxidos orgánicos en agua y alcoholes, a expensas de la oxidación de glutatión (GSH). El déficit de selenio en la dieta se ve implicado en diversas enfermedades asociadas a estrés oxidativo por el incorrecto funcionamiento de esta enzima [3, 4, 6, 7].

Por otro lado, se han visto efectos nocivos para la salud y el funcionamiento celular en presencia de altas concentraciones de selenio en la dieta. El exceso de este compuesto está asociado a la sustitución aleatoria de cisteína por selenocisteína en proteínas, lo cual lleva al mal plegamiento y pérdida de función de muchas proteínas esenciales para el correcto funcionamiento celular. También se ha atribuido la toxicidad del selenio a un desbalance redox y estrés oxidativo generado por el selenio en sí o por derivados del mismo que puedan actuar como cicladores redox fútiles que pueden agotar la reserva reductora celular [8, 9]. En humanos, se ha visto que un exceso de selenio en la dieta conlleva a pérdida de cabello, lesiones en la piel y uñas, hipertensión y taquicardia. También se ha asociado esta condición a un aumento en el riesgo de contraer diabetes de tipo 2. Neurológicamente, puede causar enfermedades motoras, que en casos extremos pueden ser fatales. Otros síntomas de intoxicación pueden ser anemia, tos seca, fiebre e hipersalivación [4].

### 1.1.2 Metabolismo

En la naturaleza el selenio se puede encontrar tanto formando parte de compuestos orgánicos como de inorgánicos. Este elemento tiene varios estados de oxidación naturales: Se elemental (0), selenuro (-2;  $\text{Se}^{-2}$ ), selenito (+4;  $\text{SeO}_3^{-2}$ ) y selenato (+6;  $\text{SeO}_4^{-2}$ ). En su forma orgánica, se encuentra formando parte de selenoaminoácidos derivados de selenuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{Se}$ ). Las estructuras químicas de selenio se ven representadas en la Figura 1.

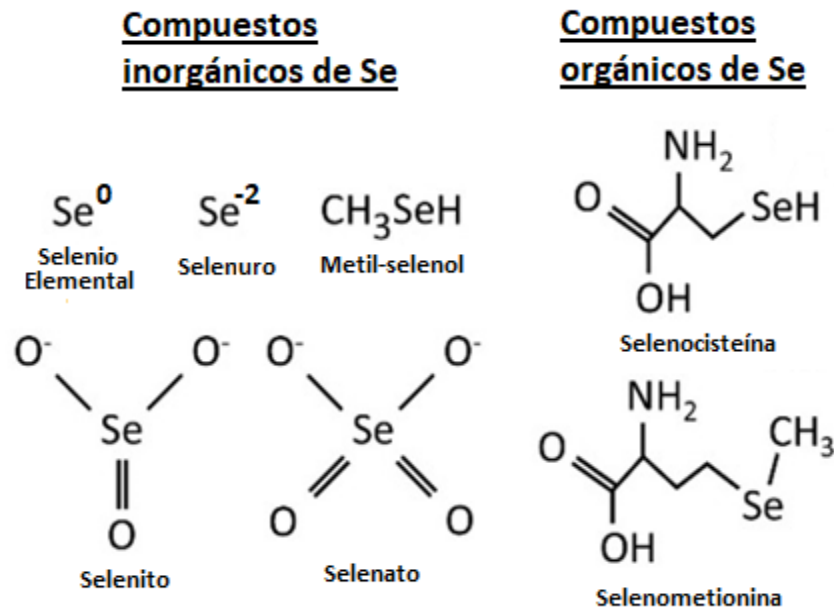


Figura 1: Especies químicas de selenio que se encuentran en la naturaleza.

En la dieta, las formas inorgánicas de Se más comunes son selenito y selenato. El mecanismo de absorción a nivel intestinal no está totalmente elucidado y parece depender de la naturaleza química del compuesto. El transporte de selenato es mediado en una gran cantidad de especies por transportadores activos de sulfato [6, 10, 11, 12, 13]. En cambio, el transporte de selenito es menos claro, y más diverso entre especies. En bacterias, el selenito parece ser transportado también por bombas de azufre, y se ha relacionado con transportes dependientes de diversos aniones ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{SO}_4^{2-}$ ), aunque se sigue proponiendo un transporte alternativo todavía no descubierto [14]. En levaduras, se ha encontrado que el selenito es transportado activamente por transportadores de fosfato [15] y de ácidos monocarboxílicos [16]. En plantas, este compuesto es transportado activamente por transportadores de fósforo [12, 17] y de silicio [18].

En animales se han registrado dos vías por las cuales se da el transporte de selenito: una dependiente de un transportador de zinc y bicarbonato, que parece ser la principal forma de ingreso de selenito en cultivos celulares humanos, en ovocitos de *Xenopus leavis*, en embriones

y glóbulos rojos de ratón [19]. Recientemente se descubrió un segundo transportador de selenito, menos específico, que actúa a pH ácido, y se estima que es relevante a nivel intestinal [20].

Una vez dentro de las células, tanto el selenito como el selenato deben ser reducidos a  $H_2Se$  para poder ser incorporado en selenoproteínas en forma de Sec. En muchos organismos el selenito es reducido de forma no enzimática por el GSH. Esta reacción, la cual puede dar lugar a diversos intermediarios, no está totalmente elucidada. Siendo así, existe evidencia de que el principal producto es selenodiglutatión (GS-Se-SG) [10, 21, 22]. *In vitro*, GSSeSG puede ser reducido a  $H_2Se$  por la tiorredoxina (TRX), tiorredoxina reductasa (TRXR) y glutatión reductasa (GR) de mamíferos; por la TRX de *E. coli*; y por la GR de levaduras [21, 23]. Asimismo, el selenito puede actuar directamente como sustrato del sistema tiorredoxina (TRX y TRXR) y ser reducido a  $H_2Se$  [24]. En las vías asimilativas de selenio, el  $H_2Se$  juega un rol clave ya que es el precursor del selenofosfato, el sustrato de la enzima encargada de sintetizar Sec-ARNt<sup>Sec</sup>.

Por otro lado, se conoce la existencia de mecanismos capaces de absorber selenio orgánico en forma de selenometionina (SeMet) y de Sec. La SeMet es transportada por los mismos mecanismos de absorción de Met, mientras que de Sec no se conocen los mecanismos, pero es tan efectivo como el de SeMet [25].

Una vez dentro de la célula, la Sec es convertida en  $H_2Se$  por acción de la enzima  $\beta$  liasa [26]. En cambio, la SeMet parece tener tres posibles destinos. Puede ingresar al ciclo de la metionina, siendo primero convertida a seleno-homocisteína y luego a Sec por la vía de transelenación análoga a la vía de transulfuración, la cual involucra las enzimas cistationina  $\beta$  sintasa y cistationina  $\gamma$  liasa [26]. Asimismo, en condiciones de exceso de selenio, la acción de la cistationina  $\gamma$  liasa puede transformar SeMet en metil-selenol ( $CH_3SeH$ ), metabolito del cual se sospecha que puede ser desmetilado para formar  $H_2Se$  [27, 26]. Por último, dependiendo de la concentración de SeMet en la célula en relación a la de Met, puede ser tomada como sustrato de la metionil-ARNt<sup>Met</sup> sintetasa y ser introducida de forma aleatoria en proteínas en vez de metionina.

No todo el selenio ingerido es asimilado. En animales, bajo concentraciones no tóxicas de Se, es excretado en la orina en forma monometilada [28, 26, 29]. En un principio se creía que en producto de excreción era metilselenol, pero estudios más rigurosos llevó a la identificación de Se-metil-N-acetilgalactosamina (selenoazúcar B) en orina [29, 26]. Se piensa que este compuesto es sintetizado a partir del selenoazúcar A: Se-glutationil-N-acetilgalactosamina. Se han descubierto otras formas de selenio conjugadas a azúcares, pero se encuentran en menor proporción que el selenoazúcar B [29]. Bajo un exceso de selenio, se puede encontrar en la orina en su forma trimetilada (TMSe) y puede ser eliminado por la exhalación en su forma dimetilada [28, 26, 29]. Por otro lado, el contenido de selenio en la leche es relativamente bajo, pero incrementa significativamente con la implementación de suplementos [6].

### 1.1.3 Selenio en la dieta

No todas las especies obtienen Se de la misma fuente, por lo que los mecanismos de absorción se adaptan a la especie química de Se a ser utilizada. Tanto bacterias, como levaduras y plantas absorben selenio inorgánico del ambiente por las diferentes vías ya mencionadas, y luego es incorporado en proteínas en forma de selenoaminoácidos. El caso de las plantas es particular. No se conocen plantas que codifiquen para selenoproteínas, por lo que no tienen un mecanismo de incorporación de Sec específico. Las plantas utilizan selenato, la mayor fuente de Se en suelos, en donde es asimilado por una vía análoga a la del metabolismo del sulfuro. La incorporación de Se en selenoaminoácidos y posteriormente en proteínas ocurre de modo aleatorio. El selenio sustituye al azufre tanto en la cisteína como en la metionina, y luego estos selenoaminoácidos son incorporados de forma aleatoria en las proteínas en sustitución de los aminoácidos originales [30].

La forma predominante de obtener Se de la dieta en humanos es a través de la ingesta de proteínas, en donde el Se se encuentra en su forma orgánica [4]. La bio-disponibilidad del Se ingerido depende de la forma en la que se encuentra y de la cantidad de proteína, grasa y metales pesados que tiene el alimento. La cantidad que se puede obtener de un mismo alimento obtenido de diferentes regiones es diversa y depende de factores como: la cantidad de Se en el suelo, el tipo de suelo, las condiciones agro-climáticas y el tipo de cosecha que se da en la región geográfica. También puede afectar la forma y tipo de cocción, debido a que se pueden formar compuestos volátiles de Se. Los alimentos que tienen una mayor cantidad de Se son los cereales, la carne y los productos lácteos. Por otro lado, las frutas y verduras son caracterizadas por tener bajas concentraciones de Se, mientras que porciones más ricas en proteínas de la planta están asociadas a una mayor cantidad de este elemento [4].

### 1.2 Selenio, selenocisteína y selenoproteínas

Se han descrito tres roles biológicos del selenio: 1) formando parte de la 2-selenouridina en la posición de “balanceo” del anticodón (primera base) de algunos ARNt de ciertos procariontes [31], 2) como cofactor, junto con molibdeno, en algunas molibdoenzimas en bacterias, estando ambos elementos involucrados en la catálisis [32], 3) formando parte de Sec en ciertas proteínas, que es la de distribución filogenética más amplia y la única forma de Se presente en animales.

A estas proteínas se las denomina selenoproteínas, en su mayoría enzimas con actividad redox, en donde Sec juega un rol fundamental en el sitio activo. Dentro de las selenoproteínas no se incluyen aquellas que incorporan SeMet. Esto se debe a que no se conocen genes que codifiquen para la biosíntesis de este aminoácido, ni para su incorporación específica a la cadena peptídica, o una función clara relacionada con este aminoácido [33].



### 1.2.1 Comparación Sec vs Cys

La incorporación de Sec en selenoproteínas es un proceso energéticamente costoso, el cual resulta en enzimas con una actividad enzimática mayor que proteínas homólogas que presentan Cys en lugar de Sec. Estructuralmente, Sec difiere de Cys por la sustitución del átomo de azufre por un átomo de Se (ver figura 1). Este hecho lleva a pensar que las cualidades que hacen que las selenoproteínas catalicen reacciones de naturaleza redox con una velocidad de reacción mayor recaen sobre el átomo de Se [34, 35]. El selenio se encuentra justo debajo del azufre en la tabla periódica, ambos formando parte del grupo de los calcógenos. Se cree que el efecto combinado de las ligeras diferencias fisicoquímicas entre estos dos elementos, entre las cuales se incluyen un mayor radio atómico y distancia de enlace del selenio, sumado el hecho de que es un átomo más polarizable y tiene menor energía de enlace diatómica, determinan las genuinas diferencias bioquímicas entre Sec y Cys encontradas en proteínas [34]. Diferentes autores han atribuido la mayor reactividad de las selenoproteínas a la mayor nucleofilicidad de Sec [34] [35], cualidad que deriva de la combinación de factores como lo son el pKa, polaridad, electronegatividad y radio atómico [34]. Se encontró que a pH fisiológico, la mayor nucleofilicidad de Se, posiblemente junto con la alta probabilidad de que actúe como grupo saliente, puede llevar a una reacción dos órdenes de magnitud más rápida que con el correspondiente compuesto de azufre [34]. De todas formas, estas características no explican por qué existen homólogos que sustituyen Sec por Cys. Existen muchas especies que no codifican para ningún tipo de selenoproteína, y en su lugar sustituyen el residuo de Sec con un residuo de Cys. Diferentes autores han presentado hipótesis y argumentos intentado explicar esta cuestión [34] [35] [36], pero al día de hoy no hay un consenso definido.

### 1.2.2 Selenoproteínas

Las selenoproteínas se encuentran presentes en los tres dominios de lo viviente, aunque no en todas las especies [1]. El conjunto de selenoproteínas de una especie se denomina selenoproteoma. En humanos, se conocen 25 proteínas que incorporan Sec en su estructura [37]. En mamíferos están involucradas en la función inmune, cardiovascular, hormonal, y reproductiva [38]. La primera selenoproteína descubierta en mamíferos fue la enzima GPX en 1973 a partir de eritocitos bovinos [39]. Hoy en día es una de las selenoproteínas más caracterizada, junto con las yodotironinas de yodinasas y la TRXR.

La mayoría de los miembros de estas familias tienen actividad óxidorreductasa y se caracterizan por presentar Sec en su sitio activo. En mamíferos, se puede dividir esta familia en dos subgrupos de acuerdo con la posición de Sec [37]. Uno de ellos posee este residuo próximo al c-terminal, como es el caso de la TRXR [1]. Por lo contrario, el segundo grupo posee Sec en la zona n-terminal, y en la mayoría de los casos estas proteínas poseen una estructura denominada plegamiento tiorredoxina y un motivo CXXU, correspondiente al motivo del sitio activo de la

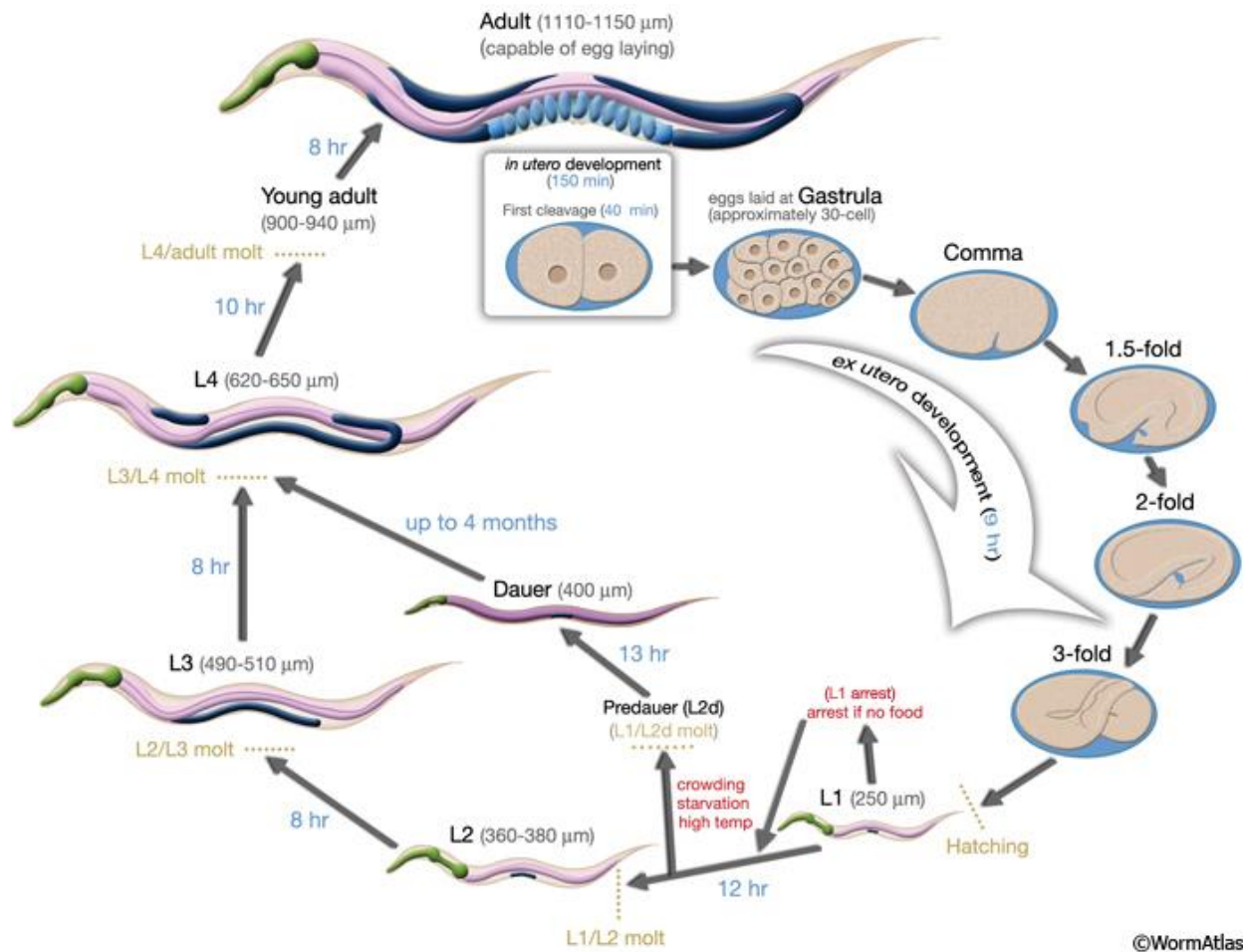
tioredoxina CXXC. Dentro de este subgrupo se incluyen las enzimas GPX y yodotironina deiodinasa, entre otras [1].

Por otro lado, existe excepción a que la posición de Sec esté asociada al sitio activo de una enzima con actividad redox. La selenoproteína P (SELENOP), cuyo gen codifica para dos o más residuos de Sec [1]. En mamíferos, las SELENOP pueden tener entre 7 y 16 residuos de Sec (en humanos posee 10) y se asocia a una reserva de selenio en plasma. Se ha encontrado que la cantidad de residuos de Sec de estas proteínas es proporcional al tamaño del selenoproteoma, lo cual es consistente con el transporte y utilización de este aminoácido en el organismo [40].

### 1.3 *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* es un nematodo de vida libre perteneciente a la familia *Rhabditidae* que se encuentra en ambientes templados. Las larvas miden aproximadamente 0,2 mm y la longitud del adulto ronda el milímetro [41]. Se alimenta principalmente de bacterias y pequeños eucariotas, y en la naturaleza es aislado de materia vegetal en descomposición [42]. Anatómicamente está compuesto por una capa de epidermis (tradicionalmente llamada hipodermis) que se encarga de secretar la cutícula y encierra una cavidad pseudocelómica llena de líquido que contiene el sistema de órganos. Hacia el interior de la epidermis está el conjunto de músculos que controlan el movimiento del organismo, así como los cordones nerviosos ventral y dorsal los cuales inervan los músculos. Dentro de la región neuro-muscular se encuentra el sistema digestivo, excretorio y reproductivo [41].

Este organismo eclosiona del huevo fuera del progenitor. Su ciclo de vida está compuesto por cuatro etapas larvares y una etapa adulta. La finalización de cada etapa está marcada por un período de letargo [43] en donde se sintetiza la nueva cutícula [44]. La embriogénesis se da en 16 h aproximadamente y luego de la cual eclosionan larvas, en el estadio L1, con 558 núcleos [41]. Bajo condiciones de temperatura y nutrientes óptima, el organismo permanece 16 h en la primera etapa larvaria (L1), y luego se encontrará en cada una de las etapas alrededor de 12 h [43]. Luego de las 12hs de haber llegado a la etapa adulta, ocurre la fecundación, embriogénesis y comenzará la ovoposición [41]. Incubándolos a 25°C, demoran 72 h en desarrollarse de embrión a adulto fértil [41]. El ciclo de vida completo se esquematiza en la Figura 2. Los gusanos ponen huevos entre dos y tres días (un total de aproximadamente 300 huevos) y después pueden vivir alrededor de 15 días más. En el laboratorio se cultivan en placas Petri con medio de cultivo y en general se utiliza la cepa de *Escherichia coli* OP50 como alimento [45, 46]. Esta cepa de *E. coli* es auxótrofa de uracilo y el crecimiento se ve limitado en el medio utilizado. Este efecto es deseado ya que permite una observación más clara y facilita el apareamiento entre gusanos. El rango de temperaturas en el que se desarrollan normalmente es de 15-25°C, siendo a menor temperatura más lento el desarrollo. A 15°C pueden sobrevivir durante meses [47], y también es posible congelarlos en una solución con glicerol a -80°C para almacenarlos de forma indefinida [45].



©WormAtlas

Figura 2: Esquema del ciclo de vida de *C. elegans*. En la imagen se muestra el ciclo de vida del nematodo a 22°C. Los números sobre las flechas indican el tiempo que está el nematodo en determinado estadio. Tomado de referencia [48].

En la naturaleza, la mayoría de los individuos de esta especie se encuentran en una etapa larvaria alternativa a las descritas anteriormente denominada “dauer” [42]. Esta etapa se asocia a una respuesta ante condiciones adversas provocadas por falta de nutrientes, sobrepoblación, altas temperaturas u otros tipos de condiciones de estrés [41, 42]. Estas señales son recibidas y procesadas por larvas en etapa L1 y en la etapa L2. Desencadenan la activación de este ciclo de vida alternativo, en donde cambia la cutícula y entra en el estadio dauer, la cual es alternativa a L3 [41]. La cutícula de estos gusanos se caracteriza por cubrir absolutamente todo el organismo incluyendo la boca, de modo que no se pueda alimentar provocando una detención en el desarrollo [41]. Estos individuos tienen un comportamiento especial denominado *nictation*, en el cual se incorporan sobre la cola y agitan la parte anterior de su cuerpo. Esto les permite adherirse a la superficie de cualquier otro animal u objeto que pase sobre él y transportarse a zonas nuevas [41, 42]. En el laboratorio se pueden observar gusanos en esta etapa si se encuentran en condiciones de cultivo que le puedan generar alguna de las condiciones de estrés antes mencionadas. Cuando estos gusanos se traspasan a nuevas placas, con alimento fresco y a la

temperatura adecuada, retoman su desarrollo cambiando nuevamente la cutícula y pasando a la etapa L4.

La cepa salvaje tiene dos formas sexuales: hermafrodita y macho, los cuales se diferencian morfológicamente en el estadio L4. Los individuos hermafroditas son capaces de formar oocitos y espermatozoides, y se reproducen por autofecundación o por el cruce con un macho. Esta especie está compuesta por animales eutélicos, con 959 células en hermafroditas y 1031 en machos. Ambos poseen 5 pares de autosomas, los hermafroditas además tienen dos cromosomas sexuales (XX) mientras que los machos tienen solo uno (X0) [41]. La generación de machos se da por la no disyunción de los cromosomas X durante la meiosis en la línea germinal, con una tasa cercana al 0,2% en la cepa salvaje Bristol-N2 (N2) [41, 42]. En el laboratorio se puede aumentar la tasa de generación de machos (i) realizando un *shock* térmico de larvas L4; (ii) exponiéndolos a etanol; (iii) haciendo un *knock down* del gen *him-14* [49]. Mutaciones en los genes *him* (*high incidence of males*) aumentan la generación de machos, pero muchas de estas conllevan efectos deletéreos en la anatomía o el comportamiento en ambas formas sexuales. Dentro de estas, las mutaciones *him-5* y *him-8* son las más utilizadas para tener poblaciones de machos y hermafroditas, dado que los individuos son viables [49].

Por su parte, *C. elegans* posee varias características que lo identifica como un excelente modelo biológico para estudiar cuestiones de desarrollo, electrofisiología, neurobiología, división celular, metabolismo y transducción de señales, entre otros. Es un organismo pequeño, con capacidad de generar una gran progenie, transparente, de ciclos de vida corto y número de células invariante, fácil de cultivar y de bajo costo. En lo que respecta a aplicaciones genéticas, son tres las características que hacen que *C. elegans* sea una herramienta útil y sencilla: la capacidad de autofecundarse, el crecimiento rápido, y la posibilidad de criogenización y recuperación de estirpes. Gracias a la capacidad de autofecundarse, cualquier alelo mutante puede ser mantenido a través de auto-propagación luego de varias generaciones sin la necesidad de realizar cruces entre individuos. Al tener ciclos de vida cortos, de aproximadamente 3.5 días a 20°C para desarrollarse de embrión a adulto grávido, es posible obtener mutantes homocigotas (luego de dos generaciones) en una semana. Por último, la posibilidad de poder crioconservar las estirpes permite conservar mutantes sin la posibilidad de que adquieran nuevas mutaciones, o la pérdida de las mutaciones deseadas en caso de que se encuentren en heterocigosis [47].

#### 1.4 Lo que se conoce de genes involucrados en la respuesta a selenio

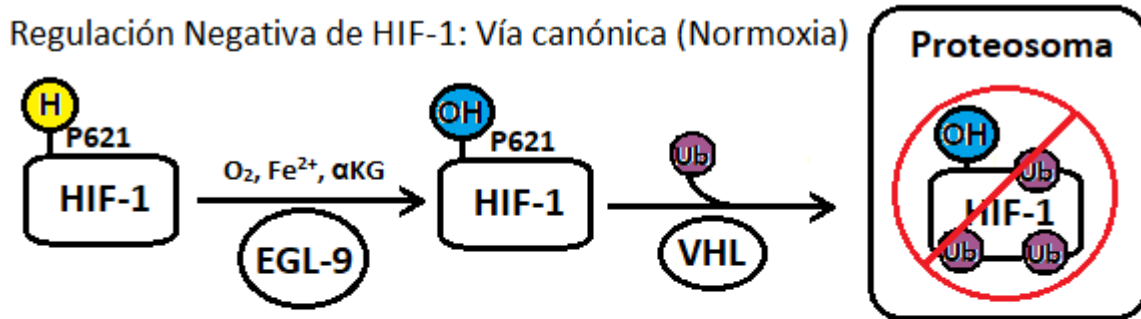
Previamente en nuestro laboratorio se propuso comprender ciertos aspectos del metabolismo del selenio que se desconocen. Para esto, se utilizaron técnicas de genética directa para mutar aleatoriamente la estirpe salvaje N2 y posteriormente se hizo un *screen* para identificar mutantes resistentes al selenio. Del *screen* se obtuvieron 14 estirpes resistentes, de las cuales se caracterizaron dos de ellas. De este trabajo se identificaron dos alelos mutantes del gen *egl-9*, el cual es un regulador negativo del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1) [50]. A

continuación, se expone un breve resumen del factor de transcripción HIF-1, su regulación por la proteína EGL-9 y las hipótesis que se manejan de este estudio.

El factor de transcripción HIF tiene un rol clave en la homeostasis del oxígeno [51]. En mamíferos, HIF es un heterodímero compuesto por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ . Este complejo se une al ADN en la secuencia conservada A/(G)CGTG de elementos de respuesta a hipoxia [51, 52]. En condiciones de normoxia, la subunidad  $\alpha$  se encuentra en el citosol, en donde es hidroxilada por una familia de proteínas con un dominio prolil-hidroxilasa (PHD), en donde en mamíferos se conoce como EGLN. Dicha hidroxilación permite que la proteína *Von Hippel-Lindau tumor suppressor* (VHL) reconozca el dominio de degradación oxígeno dependiente (ODDD) de HIF y la marque para degradación proteosomal a través de varias ubiquitinaciones. En condiciones de hipoxia HIF $\alpha$  no es hidroxilado, por lo que se transloca al núcleo y se dimeriza con HIF $\beta$  y así regula los genes de respuesta a hipoxia [51, 52, 53]. Ésta se conoce como la regulación canónica de HIF, esquematizada en la Figura 3. Otros autores proponen que existe una regulación no canónica de HIF, independiente de VHL y regulada por una actividad diferente a la prolil-hidroxilasa de las PHD [53].

La respuesta a hipoxia que se da en mamíferos por los genes *hif- $\alpha$* , *hif- $\beta$* , *egl-1* y *vhl* se encuentra conservada en *C. elegans* y es mediada por los genes ortólogos *hif-1*, *aha-1*, *egl-9* y *vhl-1*, respectivamente. EGL-9 fue la primera prolil-hidroxilasa descubierta capaz de regular la estabilidad de HIF [51] y posteriormente se encontraron homólogos en mamíferos, *Drosophila melanogaster*, *Dictyostelium*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Chlamydomonas reinhardtii* [52]. Estas proteínas pertenecen a la familia dependiente de 2-oxoglutarato, dioxigenasas de unión a hierro en forma no-hemo, en donde EGL-9 es capaz de hidroxilar la prolina 621 de HIF-1 [53].

Esta enzima utiliza como sustrato el oxígeno, 2-oxoglutarato ( $\alpha$ KG), hierro y ascorbato. Incorpora los dos átomos de oxígeno en sus productos: uno se utiliza para la descarboxilación del  $\alpha$ KG para formar succinato y CO<sub>2</sub>, y el otro se incorpora a HIF en forma de OH en un residuo de prolina. La Km de las PHD es más alta que la de otras oxigenasas, incluso más alta que la concentración de oxígeno intracelular, lo cual se traduce a que estas enzimas dependan de oxígeno mientras que los otros sustratos y co-factores se encuentren disponibles [52].



Regulación Negativa de HIF-1: Vía no canónica

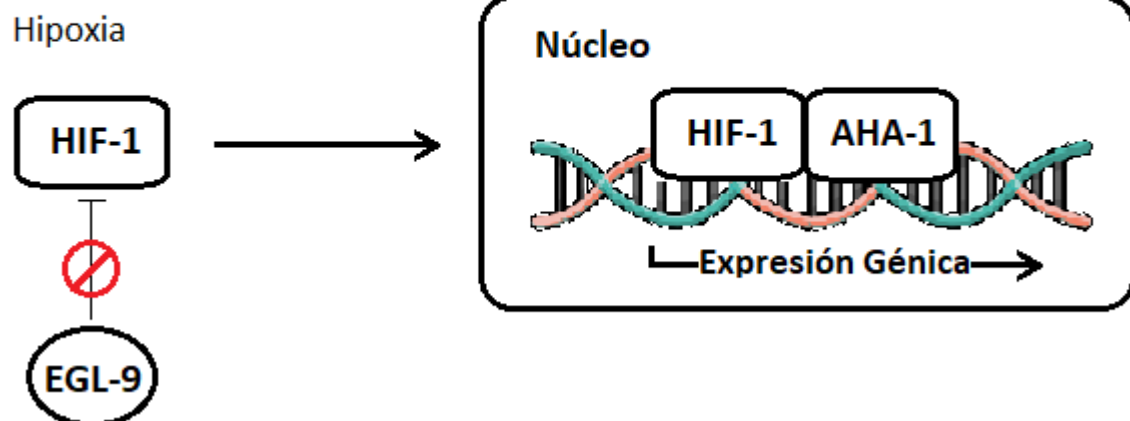
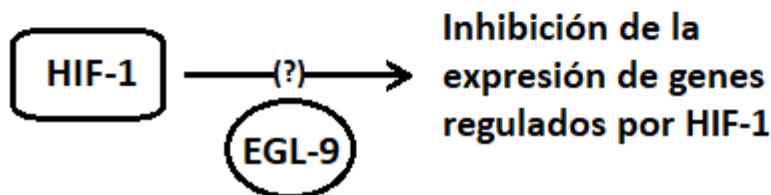


Figura 3: Mecanismo de regulación de HIF-1. En la figura se esquematiza la regulación canónica de HIF-1 mediada por las proteínas EGL-9 y VHL-1 en presencia de oxígeno, la vía no canónica mediada por una actividad diferente a la proil-hidroxilasa de EGL-9, y por último la vía de activación de HIF-1 en ausencia de oxígeno.

El  $\alpha$ KG es un intermediario del ciclo de Krebs, el cual es transportado al citosol por el transportador de malato-2-oxoglutarato y funciona como un dador de electrones para la hidroxilación de prolina. La producción de este compuesto durante normoxia es crítica para la actividad de las PHD, siguiendo un mecanismo que parece ser afectado por el metabolismo de ciertos aminoácidos. Bajo privación de aminoácidos, los niveles de 2-KG disminuyen y lleva a la inactivación de las PHD [52]. Por otro lado, el hierro en su forma reducida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) se encuentra coordinado por dos residuos de histidinas conservados en el sitio catalítico de la enzima. Cuando se lleva a cabo la reacción el hierro se oxida a  $\text{Fe}^{3+}$ . En ensayos enzimáticos *in vitro* se utiliza

ascorbato para reducir nuevamente el  $\text{Fe}^{3+}$  [54, 55], pero no hay evidencia de que participe *in vivo*, sobre todo por la baja concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  en la célula [55].

Las PHD son conocidas como sensores de oxígeno celulares [53, 52], regulando la estabilidad de HIF, el cual interviene en la expresión de genes relacionado con el metabolismo de glucosa, angiogénesis, proliferación celular y supervivencia celular [52]. Es importante aclarar que diferentes señales promueven la actividad transcripcional de HIF-1, pero causan patrones de expresión diferentes de los genes regulados por HIF-1 [56, 57]. Por otro lado, se conocen funciones de las PHD independientes de HIF, las cuales afectan el metabolismo celular, la señalización celular, la expresión génica y apoptosis [52].

En *C. elegans* el factor de transcripción HIF-1 es además esencial en la respuesta a sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) y ácido cianhídrico (HCN) [56]. Estos dos gases provocan la acumulación de HIF-1 en el núcleo. Se ha visto que en estirpes que poseen afectada la vía de regulación negativa de esta proteína, la misma se acumula en el núcleo provocando la expresión constitutiva de sus genes blanco y llevando así a la resistencia del organismo al  $\text{H}_2\text{S}$  y HCN. Estudios muestran que el aumento de actividad gracias a  $\text{H}_2\text{S}$  y HCN lleva al aumento de la expresión de *sqrd-1* y *cysl-2* [56]. SQRD-1 reduce los niveles de sulfuro en la mitocondria, actuando sobre el mismo y reduciendo una molécula de ubiquinona, previniendo el alcance a una concentración mayor a la tolerada [58]. Por otro lado, CYSL-2 cataliza la reacción de asimilación de HCN produciendo cantidades equimolares de  $\text{H}_2\text{S}$ . CYSL-1 actúa en el siguiente paso de la vía asimilando sulfuro a cisteína. Si bien CYSL-1 no aumenta en respuesta a  $\text{H}_2\text{S}$ , en presencia de este compuesto CYSL-1 funciona como una proteína de transducción de señal que se une directamente a EGL-9 y previene que inhiba a HIF-1 [56, 59]. Frente a esto, se sugiere que la respuesta mediada por HIF-1 a estos compuestos forma parte de la regulación no canónica independiente de hipoxia [56].

En relación al selenio, en el laboratorio se determinó que mutantes en *egl-9* son capaces de resistir en mayor medida a concentraciones tóxicas de selenio en comparación a la cepa salvaje, mientras que mutantes en *hif-1* resultan ser más sensibles [50]. El mismo resultado se obtiene con estas estirpes cuando son tratadas con  $\text{H}_2\text{S}$ . Exponiendo mutantes en *cysl-1* a concentraciones tóxicas de selenio, se encontró que los individuos eran sensibles, mientras que el doble mutante *cysl-1;egl-9* es resistente, indicando que *cysl-1* es un regulador *upstream* de *egl-9*, y se propone que cumpliría la función de censar Se, al igual que ocurre con  $\text{H}_2\text{S}$ . Por otro lado, la vía SKN-1/NRF2 ha sido descrita como reguladora de la expresión génica en presencia de sulfuro [60], en donde se propone que tanto la vía HIF-1 como SKN-1 actúan en conjunto para coordinar la respuesta transcripcional a este compuesto [60]. Asimismo, se ha relacionado la actividad de SKN-1/NRF2 en presencia de Se en mamíferos, en donde la ingesta de concentraciones tóxicas de selenio provoca un aumento de la expresión de genes regulados por la vía SKN-1/NRF2 [61]. En otro estudio, se demostró que *C. elegans* en presencia de concentraciones no tóxicas de selenio la resistencia a *Pseudomonas aeruginosa* se veía aumentada gracias a la activación y translocación de SKN-1 al núcleo [62]. Por otro lado, en *C.*

*elegans* existe evidencia de que la vía DAF-16/FOXO también se ve implicada en la respuesta al selenio [63], por lo que se propone que la respuesta a selenio es regulada por las tres vías (Figura 4).

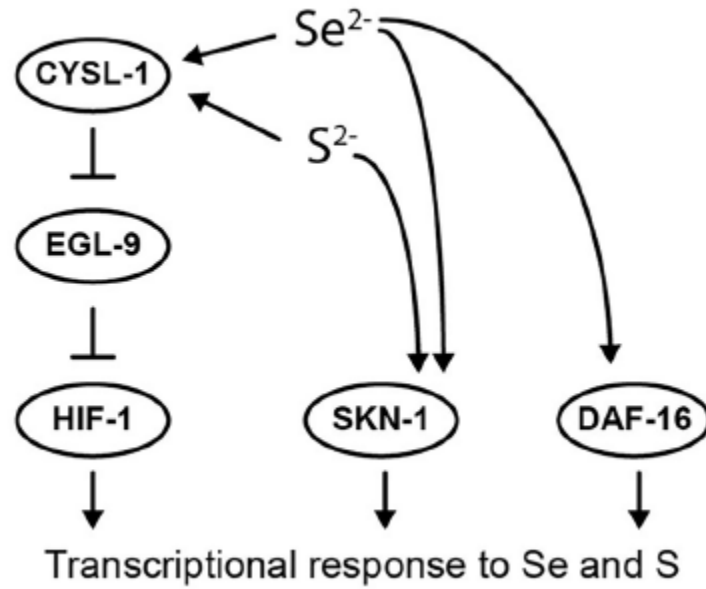


Figura 4: Respuesta al selenio involucrando a DAF-16/FOXO, SKN-1/NRF2 y HIF-1/HIF, adaptado de la referencia [50].



## 2 Objetivos

### Generales

Contribuir a la comprensión de los mecanismos de asimilación, metabolización y detoxificación del elemento traza selenio.

### Específicos

- 1) Caracterizar dos estirpes de *C. elegans* resistentes a selenio.
- 2) Avanzar en la identificación de los genes involucrados en la resistencia a selenio.

## 3 Materiales y métodos

### 3.1 Estirpes y reactivos utilizados

A continuación, se muestran las estirpes y reactivos utilizados en este trabajo.

Tabla 1. Estirpes utilizadas		
Estirpe de <i>C. elegans</i>	Alelo	Característica
N2	-	Aislado silvestre de Bristol
QW1267	<i>zf152</i>	Resistente a selenio
QW1270	<i>zf156</i>	Resistente a selenio, desarrollo retardado, retención de embriones en útero
QW1263	<i>zf150</i>	Resistente a selenio
TM10386	<i>tm10386</i>	SKN-1 KO
ZG31	<i>ia04</i>	HIF-1 KO
Estirpe de <i>E. coli</i>	Característica	
OP50	Auxótrofa para uracilo	

Tabla 2. Medios y soluciones	
Medio o solución	Componentes
Medio NGM	NaCl 3g/L, peptona 2.5g/L, colesterol 5 mg/ml, MgSO <sub>4</sub> 1 mM, CaCl <sub>2</sub> 1 mM y KPO <sub>4</sub> 0.025 M
Solución de <i>Bleaching</i>	1 vol. NaOH 5M, 1.5 vol. de NaOCl 4%, 2.5 vol de H <sub>2</sub> O
Buffer M9 (1L)	3.0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6.0 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.5 g NaCl, H <sub>2</sub> O c.s.p.
Solución de congelado 2X	NaCl 5.85 g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6.8 g/L, glicerol 300 g/L, NaOH 5.6 mM, MgPO <sub>4</sub> 0.3 mM
Buffer de lisis	Tris (pH 8.2) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl <sub>2</sub> x6 H <sub>2</sub> O 2.5 mM, Triton X-100 0.45 %, Tween 0.45%, Gelatine 0.01%, H <sub>2</sub> O c.s.p.

Azida 100 mM
--------------

**Tabla 3. Primers**

Nombre	Secuencia
Egl-9 H487 FW	GAGCGACTCTATGAACGGGG
Egl-9 H487 RV	GTGGACGGGAAGAGTCGAAG
Egl-9 Sa307 FW	GTATCGTTGTTTCTCTGCCTTG
Egl-9 Sa307 RV	GTCCCCGTTCATAGAGTCGC

**Tabla 4. Enzimas**

Nombre de la enzima	Marca
Polimerasa	Pfu DNA polymerase de Thermo Scientific
Proteinasa K	QIAGEN

### 3.2 Manejo de estirpes

Las estirpes de *C. elegans* fueron descongeladas de una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  y se mantuvieron en placas de Petri de 5 cm con medio de cultivo y alimento a  $20^{\circ}\text{C}$  durante todos los ensayos.

#### 3.2.1 Medio de cultivo y alimento

El mantenimiento general de las estirpes de gusanos se hizo en medio NGM (*Nematode Growth Medium*), de composición detallada en la Tabla 2 con un césped de la cepa de *E. coli* OP50 como fuente de alimento.

#### 3.2.2 Sincronización

Utilizando placas enriquecidas en gusanos adultos, se colectan con buffer M9 estéril (5 mL por placa). Se centrifugan a 600 g por 1 min y se descarta el sobrenadante. Se adicionan 10 mL de solución de *bleaching*. Se agita en vórtex cada 1-2 min y se monitorea el avance del proceso por observación con lupa. Cuando la mayoría de los gusanos están disueltos, se centrifugan a 1100 g por 2 min, y se descarta el sobrenadante. El pellet conteniendo los embriones se lava resuspendiéndolo con buffer M9 y centrifugando a la misma velocidad y tiempo. El lavado es repetido dos veces y luego los embriones se resuspenden en un volumen de 10 mL de M9 y se vierten a un matraz de 100 mL. Los embriones son entonces incubados a  $20^{\circ}\text{C}$  y 210 rpm, durante 20 horas. En este tiempo todos los embriones eclosionarán y dado que el medio no posee comida, quedarán arrestadas en el estadio L1.

Las larvas arrestadas en L1 se centrifugan a 1100 g por 2 min. Se descarta el sobrenadante y se homogeniza la suspensión. Se deposita  $1\mu\text{L}$  de la suspensión en un portaobjetos y en la lupa se cuantifica la cantidad de larvas. En base a la cantidad de gusanos por  $\mu\text{L}$ , se siembran entre 3000

y 4000 gusanos por placa de Petri de 9 cm con alimento. A 20°C, los gusanos llegan a adultos a las 72hs.

### 3.2.3 Congelado

Para el congelado de las estirpes, se toma 1 placa de 9 cm que tenga predominantemente gusanos en los estadios L1 y L2, después de 1 día de que se haya acabado la bacteria alimento. Se recuperan los gusanos con 3-5 mL de buffer M9 a un tubo de 15 mL y se agrega el mismo volumen de solución de congelado 2X, se mezcla, se alícuota en criotubos de 1mL y se almacena a -80°C. Inicialmente los criotubos se ubican en un bloque de espuma plast para permitir una congelación progresiva. Luego de 2 semanas uno de los tubos se descongela y se vierte el contenido en una placa de NGM con comida para monitorear el crecimiento de los nematodos como control del correcto congelado. El resto de los tubos se mantienen a -80 °C en las cajas de almacenamiento de estirpe hasta su uso.

### 3.2.4 Generación de machos

La frecuencia de aparición de machos puede aumentarse mediante un choque térmico. Para esto, entre 20 y 30 hermafroditas L4 son incubadas a 37°C durante 1 hora en una placa de NGM con alimento, y luego se pasa a 20°C. Se espera que entre 2 y el 5% de la progenie sean machos. Una vez generados, el stock de machos se mantiene mediante su cruce con hermafroditas.

## 3.3 Ensayo de toxicidad en medio líquido usando *WMicrotracker*

El equipo *Worm Microtracker* permite medir la actividad locomotora de gusanos en medio líquido en un formato de placa de 96 pocillos.

El mecanismo de detección del movimiento se basa en un sistema de haces de luz infrarroja y detectores. En la posición correspondiente a cada pocillo de la placa, dos haces de luz infrarroja atraviesan la base pocillo, la suspensión de gusanos y finalmente son detectados por un fototransistor. Cuando los gusanos por su movimiento interceptan los haces de luz, ocurre una fluctuación en la señal recibida por el fototransistor y la señal de salida de este es convertida digitalmente en un valor de actividad. Cuanto más movimiento haya en un pocillo, mayor será el número de veces que el haz de luz es interrumpido y eso es traducido en una mayor actividad locomotora. El uso de distintas concentraciones de una droga o un compuesto que afecte al gusano, se va a evidenciar en un cambio en la actividad locomotora.

Gusanos sincronizados en estadio L4 son transferidos a las placas de 96 pocillos, ~80 gusanos por pocillo en un volumen final de 100 µL. A partir de placas de NGM+OP50 con gusanos sincronizados, se levantan los gusanos L4 con buffer M9 y se transfieren a un tubo de 15 mL. Se centrifuga a 600 g durante 1 min y se saca el sobrenadante. Se lava 1-2 veces según la cantidad de bacteria que quede en el sobrenadante. Por último, se resuspende el pellet de gusanos en el medio en el cual será realizado el experimento. En el caso de esta tesis fue H<sub>2</sub>O.

En la mayoría de los experimentos se ensayaron 8 pocillos por condición por estirpe de gusano. Con esta placa, se procede a la cuantificación de motilidad en el *WMicrotracker* durante 30 minutos con los gusanos en 50  $\mu$ L de agua. Esta será la motilidad basal por pocillo (que se expresa en “counts” o conteos; en donde un conteo es la interrupción de has infrarrojo por el movimiento de gusano), esta actividad basal normaliza la actividad según el número de gusanos en cada pocillo (es decir si un pocillo tiene 70 gusanos y otro 90, esto se verá reflejado en el conteo que es proporcional al número de gusanos entre 40 y 120 gusanos). Esta normalización es importante porque al ser una suspensión de gusanos, puede haber diferencias pequeñas entre pocillos debido a heterogeneidad en la suspensión al pipetear dicha suspensión. Se agrega un volumen de 50  $\mu$ L de selenito de sodio o de agua para los controles. Los gusanos se colocaron durante 900 minutos, en donde el equipo brinda la actividad que tuvo cada pocillo en intervalos de 15 minutos. Cada uno de los valores (60 a lo largo de los 900 minutos) se expresa como la diferencia entre la actividad del pocillo en el tiempo X y la actividad del pocillo en X-15 minutos. En otras palabras, se expresa como la cantidad de veces que el haz fue interrumpido desde el último valor registrado.

### 3.4 Resistencia a Se en placa

En los ensayos de toxicidad a selenito de sodio en placa, al medio NGM agar fundido se le agregó la cantidad necesaria de selenito de sodio para la concentración final de 10 mM.

Para evitar posible interferencia del metabolismo del selenio por parte de la cepa OP50, se utilizó bacteria muerta. Para esto, un cultivo concentrado (20x) de bacteria se incubó a 65°C durante 30 min.

Entre 40-50 gusanos L4-jóvenes adultos fueron transferidos a las placas con selenito, y luego de 72 horas (o del tiempo indicado) se cuantifica el número de gusanos vivos y muertos. Aquellos gusanos que mueren por otro motivo, por ejemplo, irse a las paredes de la placa y morir por desecación, no son incluidos en el resultado. Todos los días los gusanos sobrevivientes son transferidos a placas nuevas con selenito y los muertos descartados.

### 3.5 Ensayo de desarrollo post-embrionario

Para evaluar el desarrollo post-embrionario se coloca en una placa 15-20 gusanos adultos grávidos durante 1 hora y luego son retirados. Por autofecundación de los hermafroditas quedarán en la placa embriones los cuales son evaluados cada día con respecto al estadio del ciclo de vida alcanzado. Para facilitar la designación de los estadios, se cuantifican los gusanos en tres categorías, menores al estadio L4 (es decir L1, L2 y L3), L4 y adultos.

### 3.6 Cuantificación de embriones en útero

Se aislaron 10 gusanos sincronizados en L4 y se colocaron en una placa de Petri de 5 cm con alimento, una por cada estirpe, durante 36 hs a 20°C [64]. Luego de pasado ese período, se coloca

cada gusano en una gota de solución de *bleaching* sobre un portaobjetos y se observa la cantidad de huevos en una lupa luego de que se hayan disuelto los tejidos del adulto.

### 3.7 Observación de estirpes en microscopio

Las estirpes se observaron en el microscopio Olympus IX81 con una cámara Hamamatsu ORCA ER y las imágenes capturadas con el programa 4.17 micro-manager [65]. Las muestras se prepararon en un portaobjetos con un colchón de agarosa al 2% (en agua) y se agregó una gota de azida (60 mM) para inmovilizar a los gusanos. Los gusanos fueron depositados sobre la azida y cubiertos por cubreobjetos.

La preparación de las muestras consistió en aislar gusanos L4 e incubarlos durante 36 horas a 20°C en placas con alimento. Se utilizó un aumento de 60X y se tomaron varias capturas a modo de reconstruir los gusanos completos. El mosaico fue realizado utilizando la herramienta *MosaicJ* del software ImageJ [66].

### 3.8 PCR y secuenciación

#### 3.8.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se hace siguiendo los pasos del siguiente protocolo de matanza de gusanos: se seleccionan 20 gusanos adultos y se colocan en un tubo eppendorf junto con 25 µL de buffer de lisis y 5 µl de la enzima proteinasa K (20 mg/ml). Se dejan durante 30 minutos a -80 °C. El tubo se pasa a un termociclador y se deja en un ciclo de una hora a 65 °C y 15 minutos a 95 °C. El ADN se conserva a -20 °C.

#### 3.8.2 PCR

Para la reacción de amplificación se utilizó la polimerasa Pfu de Thermo (con actividad *proofreading*). Los volúmenes utilizados para una reacción se detallan en la tabla 5.

<b>Tabla 5: volúmenes utilizados en las reacciones de PCR</b>	
<b>Compuesto químico</b>	<b>Volumen (µL)</b>
H2O csp 25 µL	18.8
Buffer 10X	2.5
dNTPs (mix 10mM)	0.5
Primer FW (10 µM)	1
Primer RV (10 µM)	1
Polimerasa	0.2
Molde de DNA	1

#### 3.8.3 Purificación de ADN amplificado por electroforesis en gel de agarosa y determinación de la concentración.

Los geles de agarosa se hicieron en una concentración de 1% y se utilizó bromuro de etidio para visualizar el ADN amplificado. El marcador de peso molecular utilizado fue *GeneRuler Ladder de Thermo Fisher Scientific 100 pb plus*. Para extraer el ADN de la banda de interés se utilizó el kit *PureLink quick gel extraction & PCR purification combo* de Invitrogen y se almacenó el ADN a -20°C.

La concentración de ADN extraído del gel se determinó haciendo uso del instrumento *NanoDrop* de *Thermo Fisher Scientific*.

#### 3.8.4 Secuenciación

La secuenciación de los fragmentos amplificados fue realizada por la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur de Montevideo, utilizando el método de secuenciación de Sanger con los secuenciadores de *Applied BioSystems 3130* y *3500*.

La secuencia de la región de ADN de interés fue comparada con el genoma de referencia que se encuentra en [Wormbase.org](http://Wormbase.org).

### 3.9 Modo de herencia y complementación

#### 3.9.1 Cruce para determinar modo de herencia

Para determinar el modo de herencia de las mutaciones en las estirpes resistentes, se hicieron cruces con machos N2. Se colocaron 2 gusanos mutantes hermafroditas en estadio L4 junto con 15 gusanos machos N2. Para cada cruce se utilizaron 4 placas en paralelo. Las placas se incuban a 20°C hasta que haya una cantidad suficiente de huevos en el agar (48 hs aproximadamente), y luego se eliminan los gusanos progenitores (P0). Los embriones se incuban a 20°C hasta que la población F1 llega al estadio L4.

La resistencia de F1 es evaluada en placas con 10 mM de selenito de sodio. En paralelo se evalúa la resistencia de gusanos hermafroditas N2 y los mutantes progenitores. Para determinar si la mutación se encuentra en el cromosoma X, se evalúa la resistencia al selenio de los hermafroditas y machos (ambos de la generación F1) por separado.

#### 3.9.2 Ensayo de complementación

Para realizar el cruce de complementación se utilizó el mutante QW1263 como estirpe de referencia, el cual tiene una mutación de pérdida de función en el gen *egl-9*. El cruce se realizó de la misma forma que en el punto anterior.

Se evaluó la resistencia de la población F1 hermafrodita en placas con 10 mM de selenito de sodio, utilizando las estirpes N2 y QW1270 como control.

#### 3.9.3 Tratamiento estadístico

Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron determinados a través de los test Shapiro-Wilk y Levene respectivamente, para lo cual se fijó un nivel de significancia del 5%

( $\alpha=0.05$ ). Para evidenciar diferencias significativas se utilizó el test de *t-Student*, en donde se fijó un nivel de significancia de 5% ( $\alpha=0.05$ ). En todos los casos, el análisis estadístico se hizo con el programa PAST.

## 4 Resultados

### 4.1 Caracterización de estirpes mutantes QW1267 y QW1270 resistentes a selenio

#### 4.1.1 Determinación de la resistencia a selenito de sodio en medio líquido de las estirpes QW1270 y QW1267

Para determinar la resistencia a selenito de sodio de las estirpes estudiadas se utilizó el equipo *WMicroTracker* siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3. Se utilizaron como controles la estirpe salvaje N2, sensible a selenio en las concentraciones estudiadas, y la estirpe mutante en *egl-9* QW1263, resistente a Se. Los resultados obtenidos en este ensayo de las estirpes QW1270 y QW1267 se representan en la Figura 5.

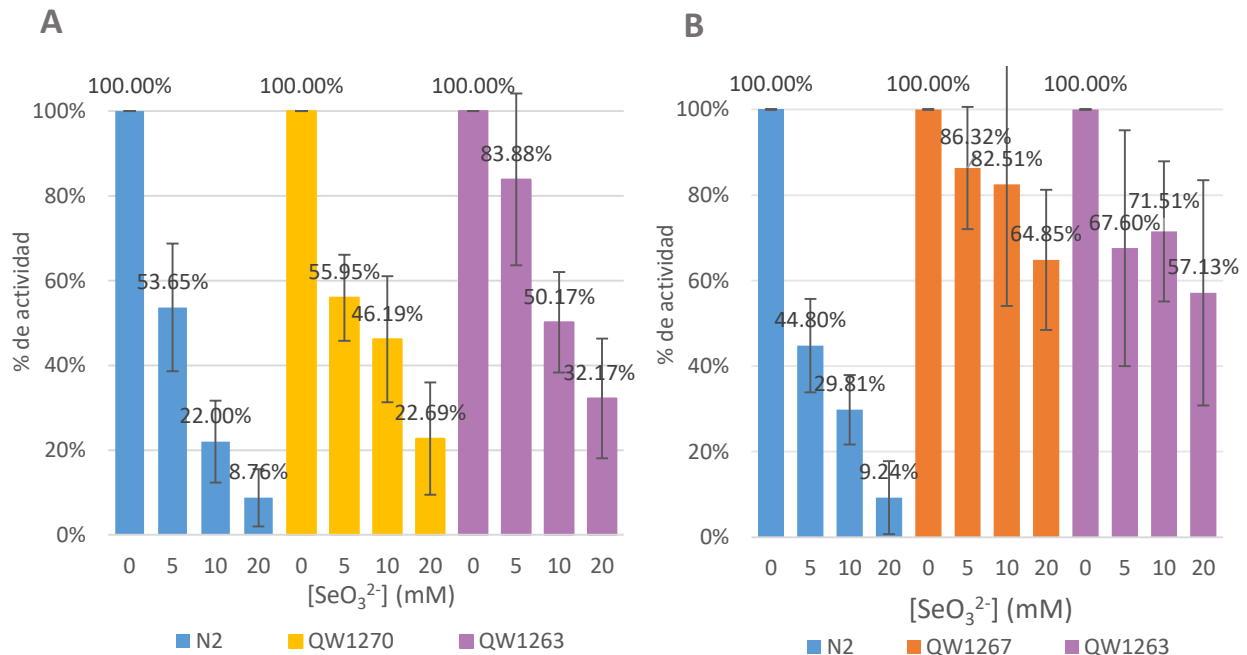


Figura 5. Resistencia a selenio en medio líquido. (A) Resistencia del mutante QW1270 y (B) resistencia del mutante QW1267. Ambas estirpes fueron sincronizadas y evaluadas en el estadio larvario L4, utilizando el equipo *WMicroTracker* y a concentraciones de 0, 5, 10 y 20 mM de selenito de sodio luego de 900 min y a temperatura ambiente. En la imagen se ve el porcentaje de actividad utilizando la concentración 0 mM como referencia. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. Cada gráfica corresponde a un experimento con 8 pocillos por condición por estirpe. Ambas pruebas fueron hechas por triplicado, ver anexo S1.

En la Figura 5 se puede ver que la actividad de las estirpes mutantes a los 900 minutos de ser tratadas con selenio es mayor que la de la estirpe salvaje. La resistencia de QW1270 (Figura 5A) se evidencia a concentraciones altas de selenio (10 y 20 mM), mientras que a concentraciones bajas parece tener una resistencia similar a N2. En cambio, el mutante QW1267 (Figura 5B) presenta una actividad similar a la de la estirpe resistente previamente caracterizada, QW1263 (en este experimento utilizada como control), frente a las diferentes concentraciones de selenio.



#### 4.1.2 Amplificación y secuenciación de *egl-9*

Dado que la resistencia al selenio de las cepas previamente caracterizadas en nuestro laboratorio (QW1263 y QW1264) se debe a mutaciones en el gen *egl-9*, se decidió estudiar si el mismo se encontraba intacto en las nuevas estirpes estudiadas: QW1267 y QW1270.

Se comenzó amplificando la región del gen que codifica para la histidina 487 de EGL-9 ya que el mutante QW1263 presenta una mutación no sinónima en la posición 1460 de una A por una C, que genera el cambio de una histidina (cAt) por una prolina (cCt). El gen completo, con las regiones UTR e intrones, posee 8398 pb por lo que se diseñaron primers adecuados para la amplificación de la región de interés (695 pb) los cuales se llamaron Egl-9 P487H FW y RV, y su secuencia se muestra en la tabla 3 de Materiales y Métodos.

El producto de la PCR se purificó en un gel de agarosa utilizando un marcador de peso molecular como referencia. Se obtuvieron bandas limpias (Figura S3, anexo) de donde se purificaron los productos de interés. El ADN fue secuenciado por el Laboratorio de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. Las secuencias fueron comparadas con el genoma de referencia que se encuentra en [wormbase.org](http://wormbase.org). Un fragmento del producto de la secuenciación se muestra en la Figura 6.

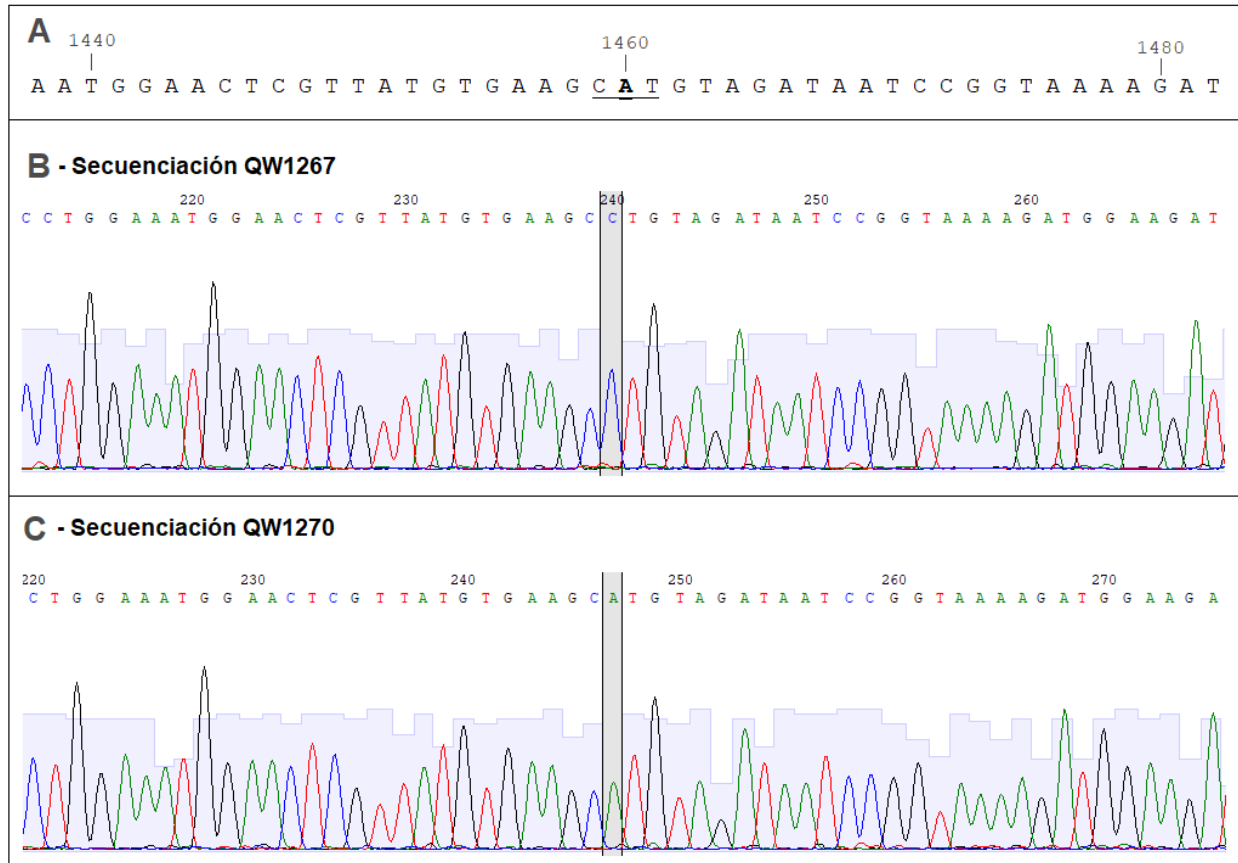


Figura 6: Producto de secuenciación de la región que codifica para la histidina 487 del gen *egl-9*. (A) Secuencia de la región 1438-1482 del transcripto F22E12.4a.1, obtenido de *wormbase.org*. En negro se muestra el nucleótido 1460, en donde previamente nuestro laboratorio encontró una mutación de A-C en mutantes resistentes al selenio. (B) Secuenciación del amplicón de *egl-9* obtenido para el mutante QW1267. Se encuentra señalado el nucleótido que corresponde a la posición 1460, una adenina en el gen salvaje. (C) Secuenciación del amplicón de *egl-9* obtenido para el mutante QW1270. Se encuentra señalado el nucleótido que corresponde a la adenina 1460 del gen salvaje.

De la amplificación y secuenciación de la región de interés se obtuvieron las secuencias mostradas en las Figuras 6B y 6C. La secuenciación resultó confiable en la mayor parte del amplicón, exceptuando las regiones 5' y 3' terminales debido al sesgo de la técnica (datos no mostrados). El mutante QW1267 presenta la mutación previamente identificada por nuestro laboratorio (mutante QW1263) de una sustitución no sinónima (cAt → cCt; H→P, alelo *zf150*). Este resultado explica el fenotipo de resistencia obtenido en la Figura 5, en donde la resistencia de QW1267 y QW1263 son similares frente a las diferentes concentraciones de selenito de sodio.

El mutante QW1270 no presenta alteraciones en la adenina 1460 (Figura 6C), por lo que se decide abordar otras estrategias para determinar la mutación que confiere la resistencia a selenio. Decidimos amplificar la región afectada del alelo *sa307* de *egl-9*, el cual presenta una delección de 243 pb en la posición 5201 del gen, asociada a una pérdida de función. Esta delección también genera un fenotipo de retención de huevos en el útero, y existían previamente los *primers* en el

laboratorio, por lo que se procedió a hacer la amplificación con los primers Egl-9 sa307 FW y RV (Tabla 3), se secuenció y se obtuvieron los datos mostrados en la Figura 7.



Figura 7: Producto de secuenciación de la región afectada del alelo sa307 de egl-9. (A) Secuencia de la región 5235-5527 del transcripto F22E12.4a.1, obtenido de wormbase.org. Se subraya la región faltante en el alelo mutante. (B) Secuenciación del amplicón de egl-9 obtenido para el mutante QW1270. La línea marca la guanina en donde comienza la delección en el alelo sa307.

El ADN amplificado de la estirpe mutante se corrió en un gel de agarosa y se obtuvo una única banda del mismo tamaño que la amplificación de N2 (datos no mostrados). La secuencia del amplicón (Figura 7B) no muestra diferencias con la secuencia del alelo salvaje (Figura 7A).

#### 4.1.3 Estudio del desarrollo post-embrionario de la estirpe QW1270

Durante el manejo de estirpes para evaluar la resistencia a Se en medio líquido, se hizo evidente que la cepa QW1270 no se desarrollaba al mismo ritmo que el resto de las estirpes, por lo que se decidió caracterizar el desarrollo post-embrionario. Para esto, se utilizó la estirpe salvaje N2 como control de desarrollo normal, y la estirpe QW1267 como control de desarrollo de un mutante resistente al selenio. Se partió de huevos de las tres estirpes y se observaron cada 24 horas en placas con medio y alimento. Se clasificaron los gusanos en cuatro grupos: huevos sin eclosionar, larvas que se encontraban entre el estadio L1 y L3, larvas en estadio L4 y adultos. Los resultados se muestran en la Figura 8.

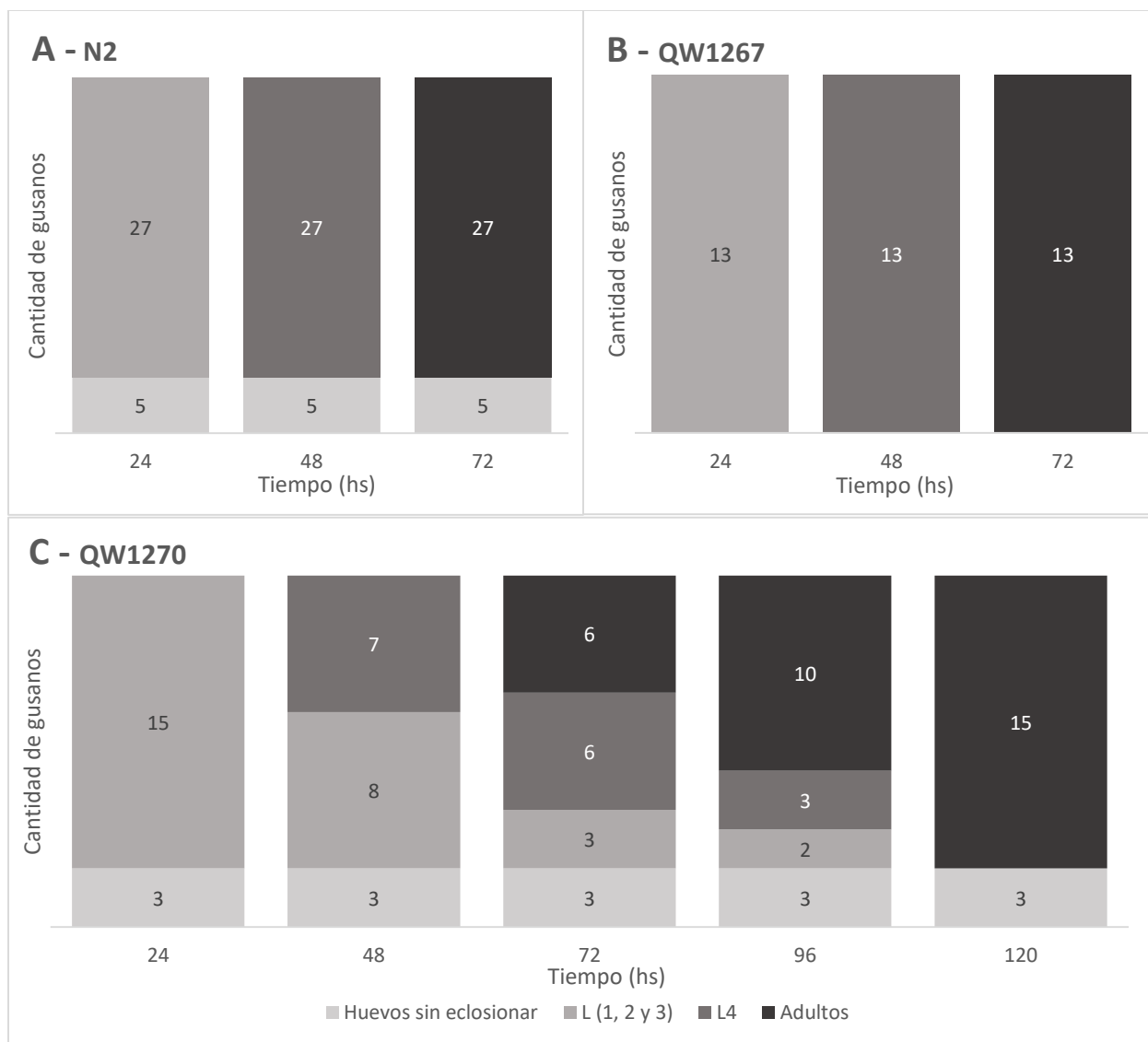


Figura 8: Desarrollo post-embrionario de la estirpe QW1270 en condiciones sin selenio. (A) Desarrollo de N2, (B) desarrollo de QW1267 y (C) desarrollo de QW1270. Cada gráfica corresponde a un experimento con una placa por estirpe. Estos ensayos fueron realizados por triplicado, ver anexo S2.

En la Figura 8 se puede ver que el desarrollo post-embrionario del mutante QW1267 (Figura 8B) es similar al de la estirpe salvaje N2 (Figura 8A), en donde demoran aproximadamente 3 días en pasar de embriones a adultos en una temperatura constante de 20°C. En el caso de la estirpe QW1270 (Figura 8C), demora 5 días en que la totalidad de los embriones vivos se desarrollen por las mismas etapas, confirmando que esta cepa tiene un retardo en el desarrollo.

#### 4.1.4 Cuantificación de embriones en útero de la estirpe QW1270.

Dado que las mutaciones previamente descritas en nuestro laboratorio poseen mutaciones en el gen *egl-9*, y a que éste gen fue originalmente descrito en estirpes mutantes como responsable de provocar un fenotipo de retención de huevos (*egl: egg-laying defective*), se decidió cuantificar

la cantidad de huevos en útero de las estirpes estudiadas. Los resultados se muestran en la Figura 9.

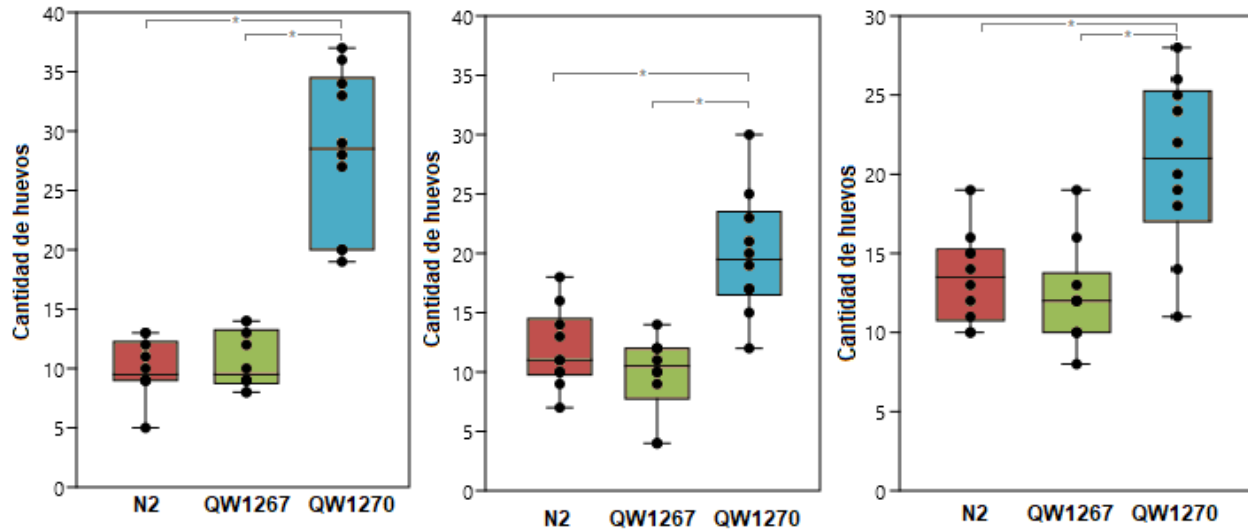


Figura 9: Cuantificación de huevos en útero en las estirpes N2, QW1270 y QW1267. Cada gráfica representa un experimento con 10 gusanos adultos de cada estirpe. Se cuantificó la cantidad de huevos en el útero de cada uno. El gráfico muestra el promedio de cada estirpe con la correspondiente desviación estándar. El asterisco representa diferencias significativas obtenidas a partir de un test de Student con un  $p$ value < 0,05.

Para cuantificar la cantidad de huevos en útero, se utilizó la estirpe salvaje N2 y la estirpe mutante resistente al Se QW1267 como controles. Se aislaron 10 gusanos L4 de cada estirpe y se dejaron crecer en placas con alimento a 20°C. A las 30 horas se picaron los gusanos y se colocaron en una gota de solución de *bleaching* sobre un portaobjetos.

No se encontraron diferencias significativas entre cantidad de huevos de la estirpe salvaje (N2 – rojo) y la estirpe resistente al Se ya caracterizada (QW1267 - verde). En cambio, si hay entre el mutante QW1270 (azul) y los controles. El hecho de que el mutante QW1270 tenga un fenotipo de retención de huevos en útero y resistencia a concentraciones tóxicas de selenio, induce a pensar que el gen *egl-9* podría estar afectado en dicha estirpe, en alguna región diferente a las previamente estudiadas. Si bien existen alrededor de 56 genes que provocan el fenotipo *egg-laying defective*, la proteína EGL-9 ha sido la única descrita con relación a la respuesta a selenio.

#### 4.1.5 Visualización de retención de embriones en útero de la estirpe QW1270

Los gusanos adultos salvajes depositan embriones que se encuentran en etapa de gástrula, con aproximadamente 30 células, y el embrión continúa su desarrollo fuera del útero y eclosiona como larva L1 a los 840 minutos luego de haber ocurrido la fecundación [48]. Los gusanos con fenotipo *egl* muchas veces depositan embriones que se encuentran en etapas más desarrolladas de la embriogénesis consecuencia de la retención de los mismos en el útero [67]. Con el fin de evidenciar la cantidad de embriones en útero se visualizaron los gusanos mutantes QW1270 por microscopía de campo claro. Las imágenes obtenidas se resumen en las Figuras 10 y 11.

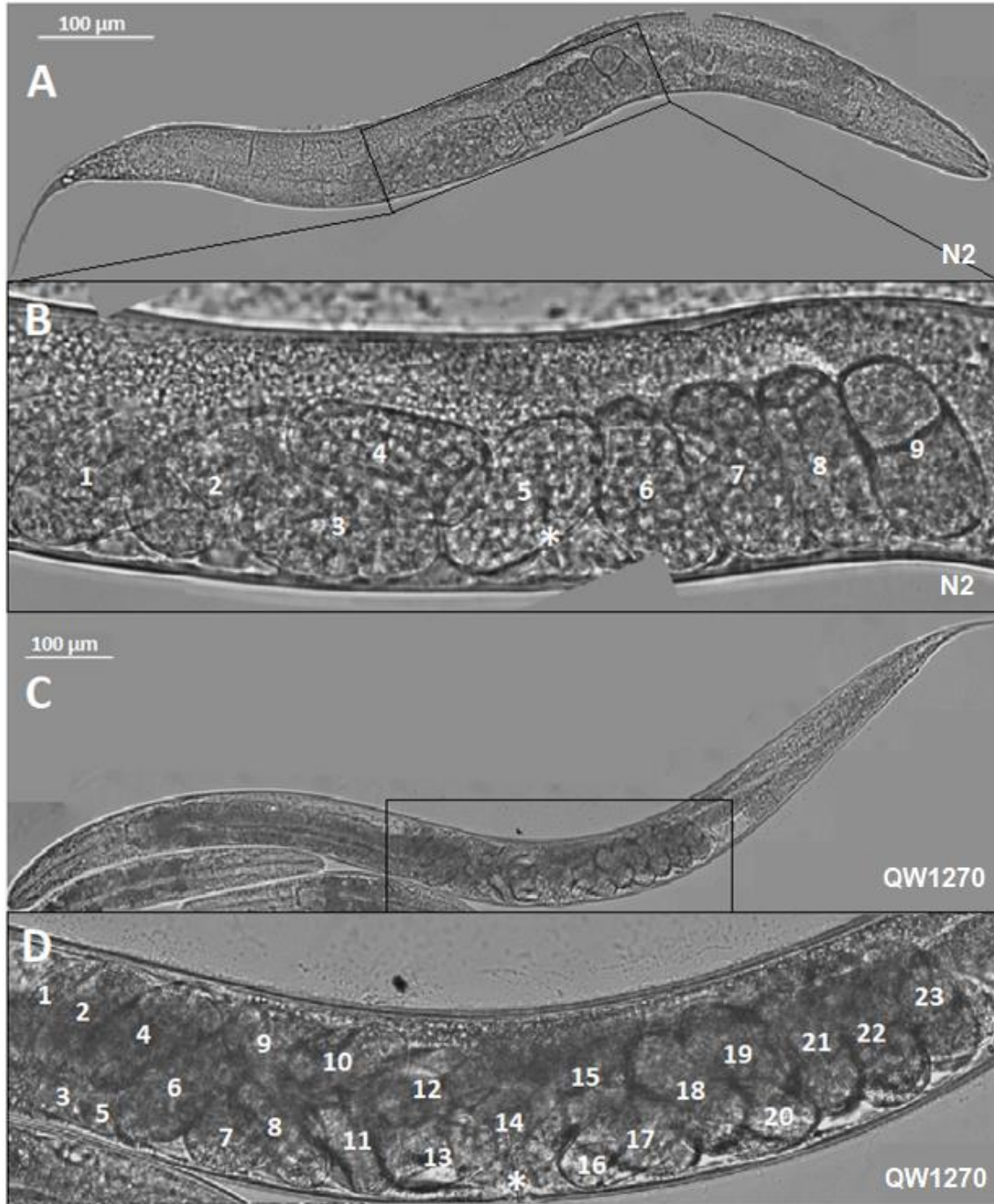


Figura 10: Microscopía de campo claro de las estirpes N2 y QW1270. (A) Mosaico de gusano adulto N2 con un aumento de 60X. (B) Ampliación del útero del gusano N2, en donde se cuentan 9 embriones. (C) Mosaico de gusano adulto QW1270 con un aumento de 60X. (D) Ampliación del útero del gusano QW1270, en donde se cuentan 23 embriones. El asterisco indica la ubicación de la vulva.

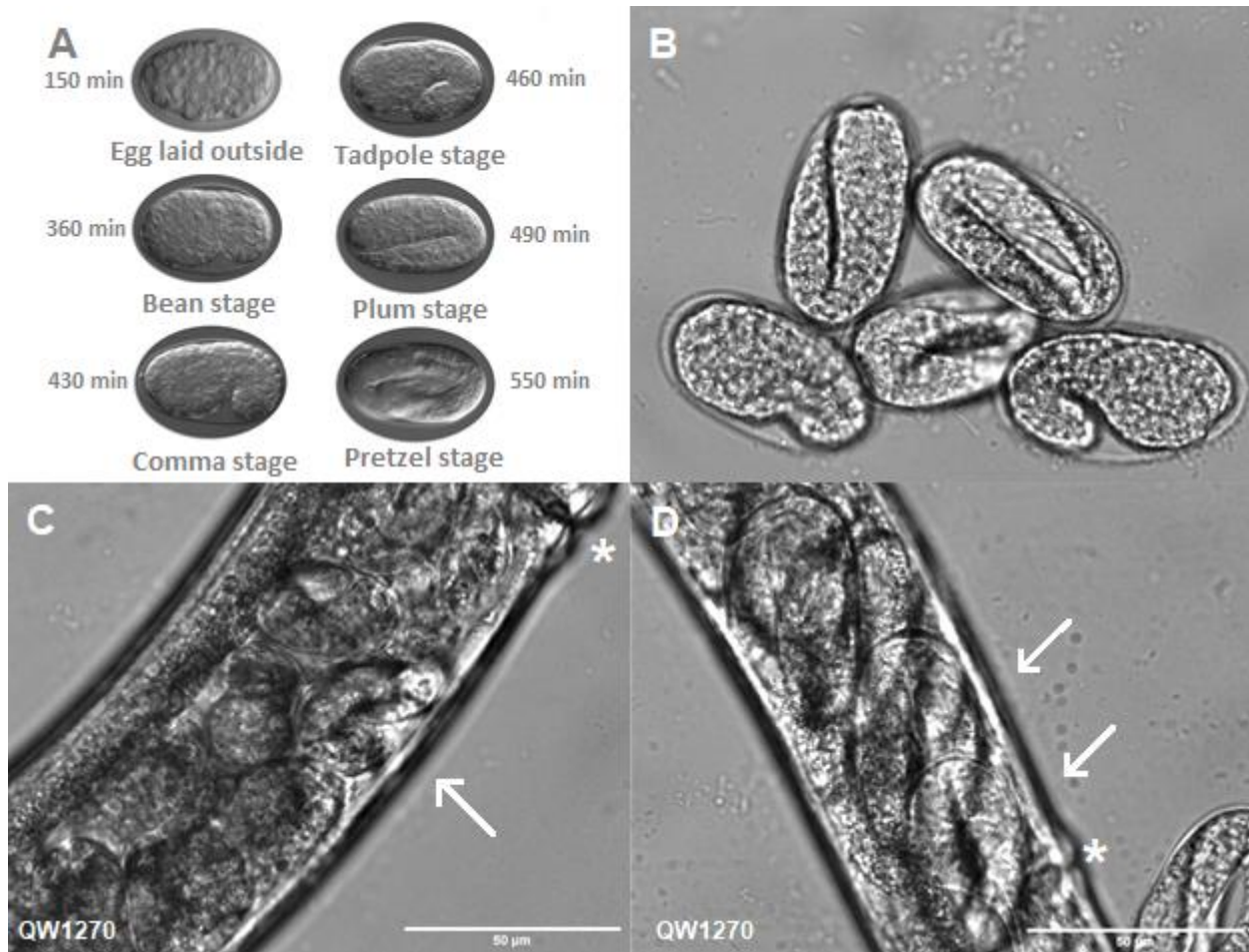


Figura 11: Desarrollo de embriones en el útero de gusanos QW1270 adultos. (A) Etapas del desarrollo embrionario de *C. elegans*. Adaptado de la referencia [48]. (B) Embriones de gusanos N2 que fueron depositados en una placa con medio sólido. En la figura se puede identificar las diferentes etapas en las que se encuentran los embriones de estirpes salvajes una vez que han salido del útero. (C) y (D) Ampliaciones (60X) de la vulva de dos gusanos mutantes QW1270 adultos. Con flechas se marca embriones en etapa de "pretzel", la última etapa del embrión antes de eclosionar larva L1. Los asteriscos indican la ubicación de la vulva.

La Figura 10B muestra una ampliación de la región del útero del gusano N2, en donde se cuentan 9 embriones. En la ampliación del útero del gusano QW1270 (Figura 10D) se llegan a contar hasta 23 embriones. Estos resultados, junto con los presentados en la Figura 9, confirman que el mutante QW1270 presenta un fenotipo de retención de embriones en útero.

En la Figura 11C y D muestra con mayor detalle los embriones que se encuentran en la proximidad de la vulva de gusanos QW1270. La Figura 11A muestra las diferentes etapas del desarrollo embrionario fuera del útero de la estirpe silvestre, en donde los embriones abandonan el útero a los 150 minutos de ser fecundados. [48]. La Figura 11B muestra diferentes estadios de embriones N2 que se encontraron en la placa. Dado que tanto los gusanos como los embriones son transparentes, se puede distinguir claramente en qué etapa del desarrollo se encuentran. Sobre la vulva de gusanos adultos QW1270 se pueden distinguir embriones que se encuentran en etapa de "pretzel" (marcado con flechas en las Figuras 11C y 11D), la cual es previa a la

eclosión. En contraposición, los embriones de N2 que se muestran en la Figura 10B se ven claramente la progresión de embriones recién fecundados con dos células a embriones en etapa de gástrula. Se ha visto en placas enriquecidas de gusanos mutantes con adultos grávidos que muchas veces las larvas eclosionan dentro de los gusanos (datos no mostrados).

Es así como estos resultados junto con los obtenidos en las Figuras 9 y 10 confirman que el mutante QW1270 tiene un fenotipo de retención de embriones en útero, en donde los embriones continúan su desarrollo dentro del gusano hermafrodita aunque no hayan sido depositados en el exterior (Figuras 11C y 11D), comportamiento que se ha descrito previamente en otros mutantes con este fenotipo [67].

#### 4.1.6 Estudio de complementación de QW1270 con una estirpe conocida mutante en *egl-9*

Dado el fenotipo de retención de huevos, y que ninguna de las regiones amplificadas del mutante QW1270 presenta diferencias con la estirpe salvaje, se buscaron alelos mutantes alternativos en el gen *egl-9* que confirieran un fenotipo de retención de embriones en útero. Los alelos *n586* y *n571* se han reportado por generar un fenotipo *egl*, mientras que de los alelos *ia586*, *ia61* y *ye49* no hay información reportada de este fenotipo. Estos alelos se encuentran distribuidos en todo el gen y para estudiarlos de forma individual es necesario diseñar por lo menos 5 juegos de primers y adicionalmente solicitar primers para amplificar la región afectada del alelo *zf151*, perteneciente al mutante QW1264. Por otra parte, con esta estrategia no estaríamos secuenciando enteramente el gen *egl-9* de alrededor de 8 kb. Vista la complejidad que implica el estudio molecular de este gen, se decidió abordar alternativas de genética clásica, mediante un cruce de complementación.

El principio de esta técnica se basa en utilizar estirpes homocigotas con mutaciones recesivas; dos alelos se complementan cuando del cruce se genera una progenie (F1) de fenotipo salvaje. En otras palabras, si los alelos se encuentran en diferentes *loci*, entonces la población F1 será heterocigota para ambos genes, y dado que las mutaciones son recesivas, tendrán un fenotipo salvaje. En cambio, si ambos alelos pertenecen al mismo *locus* entonces la población F1 tendrá un fenotipo mutante (por lo tanto, no se complementan), de resistencia a selenito en este caso.

Antes de realizar el cruce de complementación, se determinó la dominancia de la mutación respecto a la estirpe salvaje N2 y si la misma estaba ligada al cromosoma X. El ensayo clásico de complementación requiere que las mutaciones sean recesivas para poder discriminar entre heterocigotas y homocigotas en la población F1, y así determinar si son alelos del mismo gen o no. Por otro lado, sabiendo que es una mutación recesiva, se puede determinar si está ligada al cromosoma X observando la resistencia de los machos F1 en selenito (los machos son X0). Si se obtienen hermafroditas sensibles y machos resistentes, entonces la mutación se encuentra en el cromosoma sexual. En cambio, si gusanos de ambos sexos son sensibles, entonces la mutación se encuentra en un cromosoma diferente.



Para estudiar estas características se cruzó la estirpe mutante QW1270 (hermafrodita) con la estirpe salvaje N2 (macho) y se expuso la población F1 a placas con medio sólido y selenito de sodio en una concentración de 10 mM. Se decidió utilizar hermafroditas mutantes y no machos mutantes debido a que el fenotipo de desarrollo enlentecido dificulta la generación de machos. Por otro lado, este ensayo no fue posible diseñarlo en medio líquido, debido a que se necesitan por lo menos 800 gusanos de la población F1 para poder disponer 100 gusanos en cada pocillo, en donde para cada concentración (0 y 10 mM) se realizan un mínimo de 4 réplicas. Se realizaron 3 cruces independientes y se obtuvo el porcentaje de supervivencia de gusanos hermafroditas y machos que se representa en la Figura 12. Nótese que en medio sólido el fenotipo de resistencia al selenito se observa con claridad a las 72 horas. La F1 heterocigota se comporta igual que la estirpe salvaje a las 72 horas, lo cual indica que el alelo que confiere resistencia al selenito es recesivo. A tiempos de exposición más cortos la interpretación de resultados no es clara pues no hay diferencias significativas de resistencia al selenito entre N2 y la F1 heterocigota, y entre la F1 heterocigota y QW1270.

Al igual que los hermafroditas, la población de machos F1 no posee diferencias significativas en la susceptibilidad al selenio en comparación a la estirpe salvaje N2 (Figura 12B). Estos resultados determinan que la mutación que confiere la resistencia a selenio del mutante QW1270 es recesiva y no se encuentra en el cromosoma sexual.

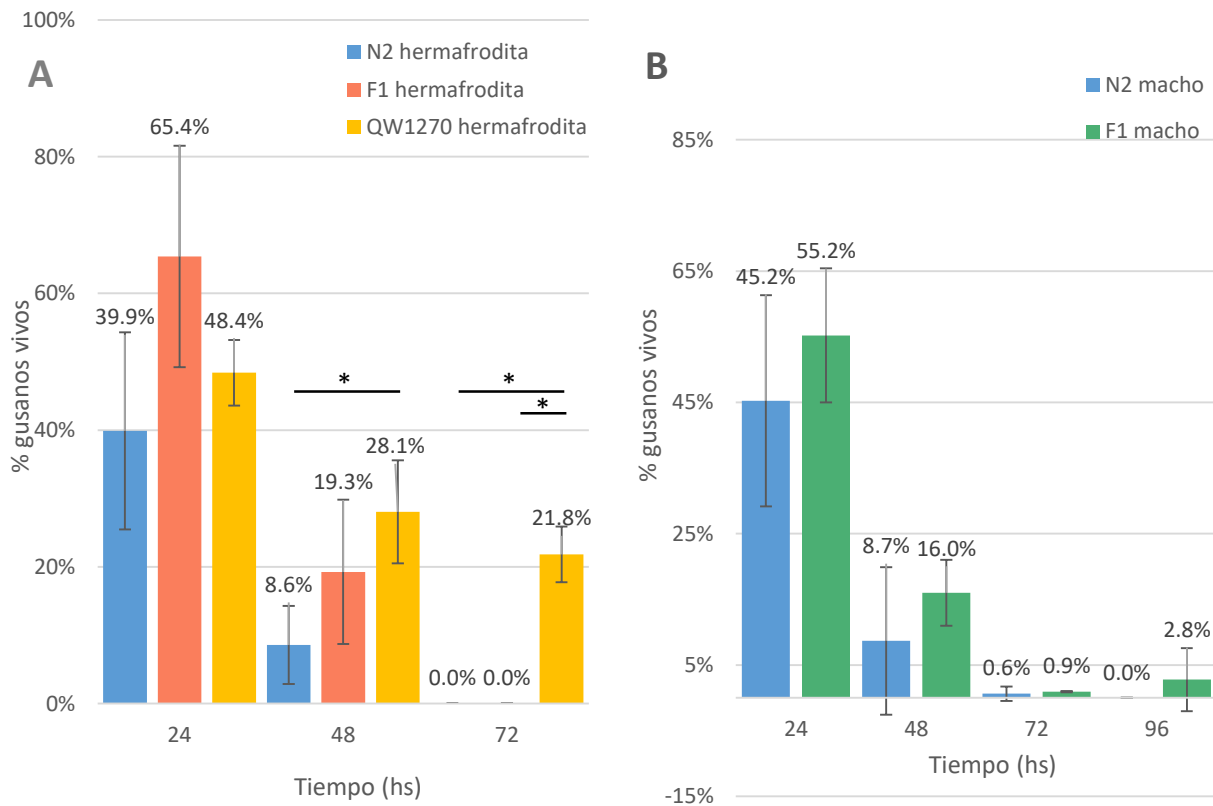


Figura 12: Resistencia a selenito de sodio (10mM) de la población F1 del cruce QW1270xN2. (A) Resistencia a selenio de la población F1 hermafrodita y parentales N2 Y QW1270. (B) Resistencia a selenio de la población F1 macho y N2 macho . Para ambos ensayos se contó la cantidad de gusanos vivos cada 24hs hasta que la totalidad de los gusanos de la estirpe salvaje N2 hubieran muerto. Los ensayos se realizaron por triplicado, en donde el porcentaje indica el promedio de gusanos vivos en el tiempo dado con su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos marcan diferencias significativas obtenidas a partir de un test de Student con un pvalue<0,05.

Una vez determinada el modo de herencia de la mutación, se procedió a hacer el cruce de complementación. Se utilizó la estirpe QW1263 mutante en *egl-9* (cAt → cCt; H→P, alelo *zf150*) previamente caracterizada en el laboratorio. Se generaron machos de esta estirpe, se cruzaron con hermafroditas QW1270 y la progenie F1 fue evaluada en medio sólido con 10 mM de selenito de sodio en el estadio L4. Los resultados se resumen en la Figura 13.

No hubo diferencias significativas en la susceptibilidad al selenito de la población F1 del cruce QW1270xQW1263 respecto a la estirpe salvaje N2 (Figura 13). Este ensayo fue realizado por triplicado, en donde en ninguna de las réplicas se evidenció algún comportamiento o fenotipo que diferenciara la población F1 de la salvaje, por lo que se puede concluir que existe complementación por lo tanto el gen afectado en la estirpe QW1270 es diferente a *egl-9*. Dado este resultado, se propondrán otros métodos para determinar qué gen se encuentra afectado en el mutante QW1270 que confiere el fenotipo de resistencia al selenio.

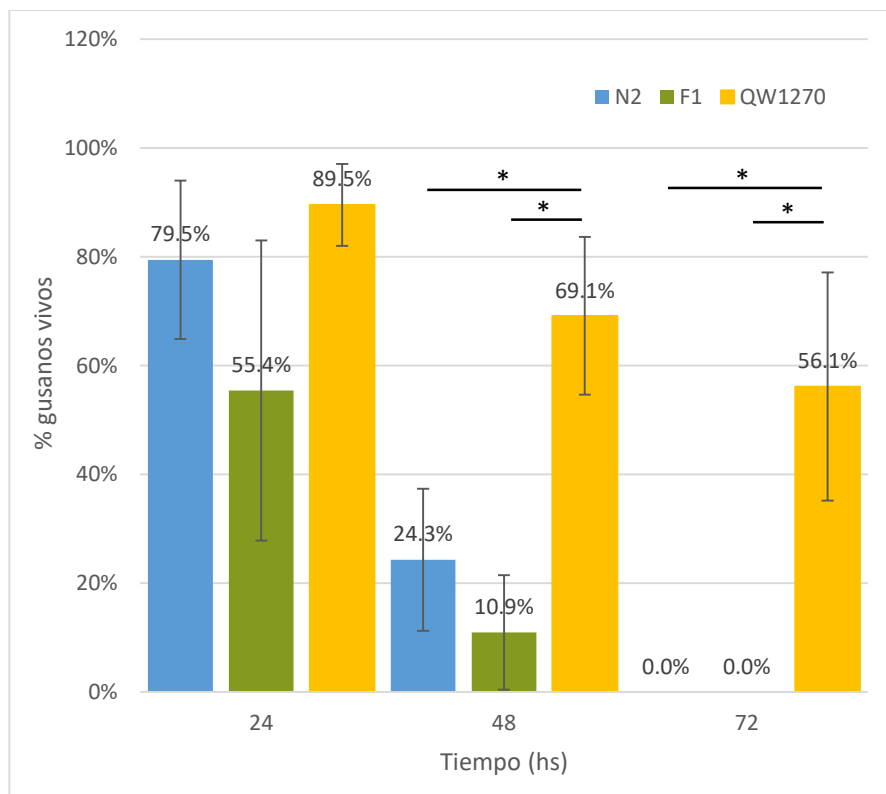


Figura 13: Resistencia a selenito de sodio (10mM) de la población F1 del cruce QW1270xQW1263. Se utilizó la estirpe salvaje N2 y al mutante QW1270 como control. Los ensayos se realizaron por triplicado, en donde el porcentaje indica el promedio de gusanos vivos en el tiempo dado con su correspondiente desviación estándar. Los asteriscos marcan diferencias significativas obtenidas a partir de un test de Student con un pvalue<0,05.

#### 4.2 Estudio de resistencia a selenito de sodio en medio líquido de una estirpe mutante *knock-out* en *skn-1*.

Dejando a los mutantes resistentes a selenito de sodio de lado, el gen *skn-1* se ha reportado como partícipe del metabolismo del sulfuro al igual que *hif-1*. El único trabajo previo que ha estudiado la respuesta de SKN-1 a Se determinó que en presencia de concentraciones no tóxicas hay una acumulación de SKN-1 en el núcleo cuando gusanos salvajes son incubados con la bacteria patógena *P. aeruginosa*. En cambio, si no hay un tratamiento previo con Se y al estar expuesto al patógeno, la cantidad de proteína en el núcleo es igual al de la estirpe salvaje [62]. No hay trabajos previos que estudien la respuesta de *skn-1* a concentraciones tóxicas de selenio, por esto decidimos evaluar la resistencia a este compuesto utilizando el mutante TM10386 (*skn-1 KO*, alelo *tm10386*) que previamente había sido solicitado por el laboratorio. La hipótesis planteada es que si *skn-1* regula la expresión de genes asociados a la desintoxicación de selenio, como estimamos que lo hace *hif-1*, entonces un mutante con pérdida de función en *skn-1* debería tener una mayor sensibilidad que la estirpe salvaje.

La susceptibilidad al sulfuro en estirpes con mutaciones en *skn-1* fue descubierta en la estirpe que posee el alelo *Zu169* (C→T, Q→STOP). Este alelo es letal en homocigosis y es necesario balancear la mutación en trans para que sea viable. Dado la laboriosidad que implica el manejo de estirpes con mutaciones balanceadas, se decidió usar la estirpe TM10386. Esta tiene una mutación del tipo delección/inserción que resulta en la eliminación de 120 pb y la inserción de 9 pb. Esta estirpe fue generada por el National Bioresource Project (Tokyo, Japón), el cual forma parte del Consorcio Internacional de *Knockouts* de *C. elegans*. El único dato fenotípico que se conoce de esta estirpe es que es viable en homocigosis. En la Figura 14 se puede ver la distancia genética entre las mutaciones de ambas estirpes antes mencionadas.

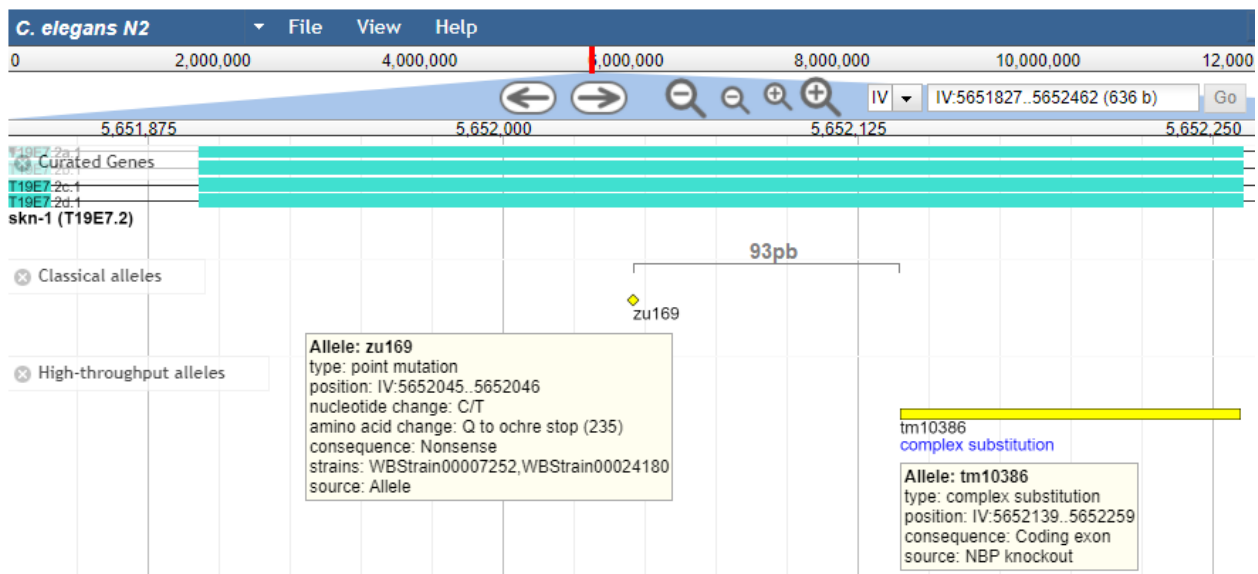


Figura 14: Distancia genética entre mutaciones de los alelos *zu169* y *tm10386* del gen *skn-1*. Ambas mutaciones afectan el exón II en las cuatro isoformas del gen. La distancia entre mutaciones es de 93pb. Imagen tomada de wormbase.org

La respuesta a selenito se midió en medio líquido. Para esto se utilizaron concentraciones de 0, 2, 5 y 10 mM de selenito. Se utilizó como control la estirpe salvaje N2 y la estirpe susceptible ZG31 (*hif-1 KO*). Los resultados obtenidos se esquematizan en la Figura 15.

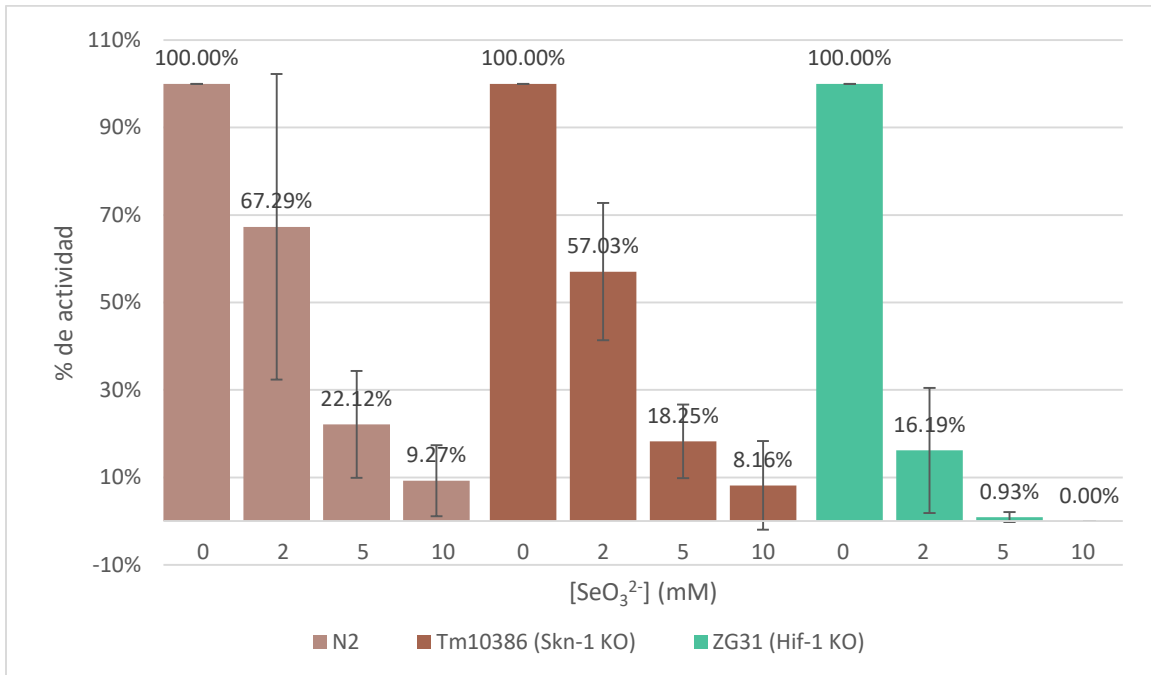


Figura 15: Resistencia a selenito de sodio en medio líquido de la estirpe TM10386 (mutante KO en *skn-1*), N2 (silvestre) y ZG31 (mutante KO en *hif-1*). Los gusanos fueron sincronizados y evaluados en el estadio larvario L4, utilizando el equipo WMicroTracker y a concentraciones de 0, 2, 5 y 10 mM de selenito de sodio. En la imagen se ve el porcentaje de actividad utilizando la concentración 0 mM como referencia. Los resultados mostrados son producto de una incubación de 900 minutos a temperatura ambiente. El ensayo fue realizado por triplicado, ver anexo S4.

En medio líquido, y haciendo uso del equipo WMicroTracker, se obtuvieron réplicas similares de la respuesta de la estirpe TM10386 a selenito. En este caso, se utilizó la estirpe ZG31 mutante *knockout* de *hif-1* como control. Observando la Figura 15 se evidencia la susceptibilidad del mutante en *hif-1* respecto al salvaje N2. No hay diferencias significativas entre la respuesta del mutante en *skn-1* y N2.

## 5 Discusión

---

Los objetivos de esta tesis se plantearon en marco de un proyecto que busca estudiar el metabolismo de selenio, elemento traza esencial para la mayoría de los linajes de lo viviente y tóxico cuando estos son sometidos a concentraciones moderadamente altas del mismo. Por un lado, se caracterizaron dos estirpes de *C. elegans* resistentes a Se que fueron generadas por mutagénesis aleatoria y seleccionadas por su resistencia a concentraciones tóxicas de selenio previo al inicio de este trabajo [50]; y por otro, se estudió la respuesta a selenio de una estirpe mutante de delección en el gen que codifica para un factor de transcripción el cual se presumía que podía estar involucrado en la desintoxicación frente a altas concentraciones de Se.

### 5.1 Caracterización de estirpes resistentes a Se.

De las 14 estirpes mutantes que se generaron en el laboratorio, para este trabajo se tomaron la QW1267 y la QW1270. La estirpe QW1267 posee un fenotipo de desarrollo y puesta de huevos idéntico al de la estirpe salvaje N2. Del estudio molecular, se llegó a que el fenotipo de resistencia a selenio estaba dado por una sustitución no sinónima de A por C en el gen *egl-9* que genera la sustitución de histidina por prolina en el sitio activo de la enzima. Esta mutación fue descrita anteriormente en otra estirpe generada en nuestro laboratorio, QW1263. Coincidentemente la estirpe QW1263 se utilizó como control de resistencia a Se en los ensayos en medio líquido, por lo que explica que la resistencia sea similar.

El motivo de que ambas estirpes posean la misma mutación se puede explicar por el hecho de que provienen del mismo *screen* de mutantes. Las estirpes mutantes se generaron previo a este trabajo por mutagénesis aleatoria con ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*) y se analizó a la población F2 utilizando concentraciones letales de Se. La población parental mutagenizada (P0) se incubó de forma tal que se obtuvieron 60 placas de 9 cm pobladas con la progenie F1 producto de autofecundación. La población F1 se dividió en dos grupos (30 placas cada grupo) y se aisló la población de embriones F2, producto de autofecundación (el procedimiento detallado se encuentra descrito en la referencia [50]). Uno de los grupos se incubó hasta generar gusanos adultos grávidos, se aislaron los embriones por *bleaching* y se sometió a la población F3 a placas con concentraciones tóxicas de Se. Aquellos gusanos de la población F3 que sobrevivieron y se recuperaron, se aislaron en placas diferentes. De este *screen* se obtuvieron nueve estirpes, cada una proveniente de individuos diferentes, entre ellas QW1263 y QW1267. Dado que los embriones F3 (miles de embriones) son provenientes de una población F2 que fue sometida a *bleaching*, es posible que varios gusanos F3 resistentes a Se provengan del mismo adulto F2. En paralelo a este trabajo, se están estudiando las estirpes QW1268, QW1269 y QW1277, provenientes de este *screen*. En la estirpe QW1277 se encontró la misma mutación que el mutante QW1263, mientras que de las estirpes QW1268 y QW1269 se secuenciaron diferentes regiones de *egl-9* y *hif-1*, y no se encontraron alteraciones (Jorge Pórfido, comunicación

personal). Estas dos últimas estirpes no poseen fenotipos de retención de huevos en útero o retardo en el desarrollo.

Debido a los sesgos de este método es posible que no contemos con nueve estirpes diferentes. Hasta el momento sabemos que tres de las poblaciones aisladas de este *screen* poseen la misma mutación, en donde probablemente provienen del mismo parental F2; y que existen dos estirpes que tienen un genotipo diferente al previamente descrito. Con el fin de continuar con el proyecto y estudiar el metabolismo de selenio en eucariotas, se continuará con el análisis de estirpes provenientes de ambos *screens*.

El mutante QW1270 proviene de un *screen* diferente (el mismo del que proviene la estirpe QW1264) y posee un fenotipo de retención de huevos en útero, un desarrollo enlentecido y no posee afectada la región de la histidina 487 del gen *egl-9*. Adicionalmente se amplificó y secuenció la región afectada por otro alelo de *egl-9* que previamente se había descrito en estirpes con fenotipo de retención de huevos en útero, y tampoco se encontraron diferencias respecto a la estirpe salvaje. Ante estos resultados, se determinó que el modo de herencia era recesivo y se hizo un ensayo de complementación con la estirpe QW1263 para determinar si el alelo afectado era del gen *egl-9*. El resultado fue que ambas estirpes complementan, es decir, que del cruce de ambas la progenie tiene un fenotipo salvaje. Siendo este el resultado, es razonable suponer que el gen afectado en QW1270 no es *egl-9*. Sin embargo, es importante mencionar que existen casos en los que dos alelos de un mismo gen se complementan, y a esto se lo denomina complementación intragénica [68]. Son tres los motivos por los cuales esto puede suceder: (i) que el producto de un gen mutante reduzca la dosis de otro producto mutante, (ii) que un complejo mal plegado de un mutante sea estabilizado por el producto del otro mutante, y (iii) en el caso de proteínas que poseen más de un dominio, puede ser que ambos alelos tengan dominios diferentes afectados, y entre ambos restauren el fenotipo salvaje.

El primer caso de complementación intragénica se describió en dos alelos recesivos del gen del colágeno de la cutícula de *C. elegans*, *sqt-1*. Uno de los alelos produce un compuesto tóxico cuya concentración disminuye cuando se encuentra en heterocigosis con otro alelo mutante. Esta interacción no explicaría una complementación intragénica en los mutantes heterocigotas de *egl-9*, ya que, si un alelo redujera la expresión de otro, entonces habría menos proteína EGL-9 disponible, por lo que la estabilidad de HIF-1 sería mayor. Una mayor estabilidad de HIF-1 se traduce en una mayor resistencia a concentraciones tóxicas de Se, por lo que si éste fuera el caso, el fenotipo observado no sería el salvaje.

El segundo motivo por el cual se puede dar complementación intragénica no aplica en el caso de *egl-9* debido a que no forma complejos proteicos. Se podría pensar que el producto de un alelo interaccione de alguna forma con el producto de otro alelo y así impida su acción o estimule su degradación, pero no existen pruebas que indiquen que esto pudiera suceder.

Por último, se ha descrito que EGL-9 posee una actividad independiente al de hidroxilación que interacciona con HIF-1 e inhibe la expresión de los genes blanco, aunque el mecanismo por el cual lo hace no está elucidado [53]. Dada la existencia de dos formas de regulación negativa de HIF-1 por parte de EGL-9, podría ser que en el caso del mutante QW1263 (notoria resistencia a Se) la región responsable de esta regulación alternativa se encuentre funcional y el dominio de hidroxilación no. Esto causa que EGL-9 no sea capaz de marcar a HIF-1 para su degradación vía proteosomal, pero la vía de regulación no canónica seguiría activa. Esta actividad alternativa afectaría de alguna forma la actividad transcripcional de HIF-1, por lo que en cierta medida los gusanos QW1263 también mueren a causa de Se, pero globalmente el fenotipo observado es de resistencia.

En cambio, para el caso del mutante QW1270 (resistencia a Se moderada), podría suceder que la región responsable de la regulación no canónica se encuentra alterado pero el dominio de hidroxilación no, por lo que es capaz de marcar a HIF-1 para su degradación a través de la vía canónica y la resistencia a Se es un poco menor (dada la ausencia de HIF-1 en el núcleo).

Sumado a esto, a bajas concentraciones de Se en medio líquido la actividad de la estirpe salvaje y del mutante QW1270 es similar (Figura 5). Se obtiene el mismo resultado si ambas estirpes son incubadas en medio sólido durante 24 h a concentraciones de 10mM de selenito de sodio (Figura 12 y Figura 13). Si es que el alelo afectado del mutante QW1270 posee una mutación en el gen *egl-9* que afecta la actividad alternativa de regulación, es posible que este dominio dependa de la concentración o el tiempo de exposición al Se, y que de esta forma no se observen diferencias a la estirpe salvaje bajo estas condiciones.

Esta hipótesis plantea que la estirpe QW1270 posee una mutación que afecta el dominio de regulación alternativo de la proteína EGL-9, en donde al cruzarla con la estirpe QW1263 se restaura el fenotipo salvaje. La estirpe QW1270 tiene una resistencia menor a selenio, por lo que estaría asociado a una concentración menor de HIF-1 en el núcleo, o a una menor actividad regulatoria del mismo. Esta situación no se podría evidenciar mediante el fenotipo de resistencia al selenio. Una alternativa sería cuantificar la cantidad de HIF-1 en el núcleo a través de un western blot, u observar la expresión de genes blancos de HIF-1 con reporteros.

Si bien la estirpe QW1270 posee una retención de embriones en el útero, observando los resultados del ensayo de complementación no se debe descartar la posibilidad de que el gen afectado en relación a la puesta de huevo sea diferente a *egl-9*. Existen más de 50 genes conocidos en *C. elegans* que generan un fenotipo de retención de huevos en útero, pero solo *egl-9* se ha reportado como partícipe de la regulación del metabolismo del Se. Asimismo, de acuerdo a la wormbase (Species>Phenotype>Slow development>Variation<sup>1</sup>), no hay evidencia de que mutaciones en genes *egl* provoquen un retardo en el desarrollo de los individuos. Frente a esto, se manejan dos explicaciones: (i) que el alelo afectado en el mutante QW1270 sea de un gen *egl*,

---

<sup>1</sup> <https://wormbase.org/species/all/phenotype/WBPhenotype:0000674#06--10>

en donde se describan dos nuevos fenotipos (de resistencia a selenio y desarrollo retardado) o, (ii) que los tres fenotipos sean independientes en la estirpe. El último caso, si bien es el menos probable, se puede explicar por el hecho de que la estirpe QW1270 no ha sido retrocruzada con la estirpe salvaje para remover las mutaciones no deseadas. Debido a que el método de mutagénesis genera mutaciones en un único nucleótido de forma aleatoria en todo el genoma, se puede dar el caso de que más de una mutación se haya acumulado en esta estirpe, y como consecuencia se generen diferentes fenotipos causados por genes que no necesariamente están relacionados. De hecho, a las concentraciones y tiempo del mutágeno usado en el *screen*, el número de mutaciones esperable por organismo es de alrededor de 300.

Resumiendo, son tres las explicaciones de los resultados que se manejan con el mutante QW1270:

1. El alelo afectado es del gen *egl-9* y altera una región diferente al dominio de hidroxilación, el cual complementa con el alelo *zf150*, y afecta el desarrollo y puesta de huevos de los individuos que lo poseen.
2. El gen afectado es uno de los genes *egl*, en donde la mutación provoca dos nuevos fenotipos: resistencia a concentraciones tóxicas de Se y desarrollo retardado.
3. La mutación que genera la resistencia a Se es: independiente de los otros fenotipos y está involucrada en una nueva vía de regulación, dependiente de uno de los dos fenotipos restantes, o es responsable de los tres fenotipos y forma parte de una vía de regulación importante en *C. elegans*.

Siendo tantas las posibilidades, como perspectiva de este trabajo se propone curar la mutación de la estirpe QW1270 a través de cruza con la estirpe salvaje N2 y secuenciar su genoma completo. El secuenciado de la estirpe permitiría además identificar el gen responsable de la resistencia al selenio en esta estirpe y continuar con la caracterización de la vía de regulación o metabolización afectada.

## 5.2 Estudio de la respuesta a Se de una estirpe mutante en el gen *skn-1*

En el estudio de la relación entre el mutante de pérdida de función en *skn-1* (estirpe TM10386, alelo *tm10386, indel*) y la respuesta a concentraciones tóxicas de selenito de sodio, no se obtuvieron diferencias en la susceptibilidad respecto a la estirpe salvaje. Es relevante reiterar que en la estirpe utilizada no se ha estudiado si es susceptible al sulfuro. El único alelo que se conoce con una pérdida de función que hace a la estirpe susceptible a sulfuro es el *zu169 (C→T, Q235STOP)* [60]. La distancia génica entre las mutaciones de ambos alelos es de 93 pb (Figura 14). Encontrándose tan próximas las mutaciones, es posible que la estirpe TM10386 también sea sensible a H<sub>2</sub>S. Como primera aproximación al estudio de este gen, nos permitió determinar que la región afectada en este alelo (la región 5' del segundo exón) no se ve implicada en la actividad de SKN-1 frente al selenio.



Como perspectivas a este estudio se plantea medir la resistencia de la estirpe TM10386 a H<sub>2</sub>S para descartar que este alelo se vea involucrado en la respuesta a azufre. Por otro lado, en este momento estamos a la espera de la estirpe EU35 (*skn-1(zu169) IV/nT1 [unc-?(n754) let-?]* (IV;V)), la cual someteremos a concentraciones tóxicas de Se para evaluar su respuesta.

## Bibliografía

- [1] A. H. Jun Lu, «Selenoproteins,» *The Journal of Biological Chemistry* vol. 284, pp. 723-727, 2009.
- [2] I. o. Medicine, «Selenium,» de *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.*, National Academies Press (US), 2000.
- [3] M. P. Rayman, «The importance of selenium to human health,» *Lancet*, vol. 356, pp. 233-241, 2000.
- [4] M. Kieliszek, «Selenium—Fascinating Microelement, Properties and Sources in Food,» *Molecules*, vol. 24, pp. 1-14, 2019.
- [5] L. Flohe, W. A. Gunzler y H. H. Schock, «Glutathione Peroxidase : a selenoenzyme,» *FEBS Letters*, vol. 32, nº 1, pp. 132-134, 1973.
- [6] Y. Mehdi, J.-L. Hornick, L. Istasse y I. Dufrasne, «Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions,» vol. 18(3), nº 3292-3311, 2013.
- [7] R. A. K. Brigelius-Flohe, H. Blocker, G. Gross, M. Kiess, K. Kloppel, M. Maiorino, A. Roveri, R. Schuckelt, F. Usani y e. al, «Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase,» *J. Niol. Chem.*, vol. 269, pp. 7342-7348, 1994.
- [8] M. Mézes y K. Balogh, «Prooxidant mechanisms of selenium toxicity - a review,» vol. 56, nº 15-18, 2009.
- [9] S. Misra, M. Boylan, A. Selvam, J. E. Spalholtz y M. Björnstedt, «Redox-active selenium compounds—from toxicity and cell death to cancer treatment,» vol. 7, nº 3536-3556, 2015.
- [10] R. J. Turner, J. H. Weiner y D. E. Taylor, «Selenium metabolism in Escherichia coli,» vol. 11, nº 223-227, 1998.
- [11] V. Mapelli, P. R. Hillestrøm, K. Patil, E. H. Larsen y L. Olsson, «The interplay between sulphur and selenium metabolism influences the intracellular redox balance in *Saccharomyces cerevisiae*,» *FEMS Yeast Res*, vol. 12, pp. 20-32, 2012.
- [12] H.-F. Li, S. P. McGrath y F.-. J. Zhao , «Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite.,» *New Phytol*, vol. 178, nº 1, pp. 92-102, 2008.
- [13] M. Bebien, J. P. Chauvin, J. M. Adriano, S. Grosse y A. Verméglio, «Effect of Selenite on Growth and Protein Synthesis in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*,» *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, pp. 4440-4447, 2001.

- [14] M. Lusa, J. Knuutien y M. Bomberg, «Uptake and reduction of Se(IV) in two heterotrophic aerobic Pseudomonads strains isolated from boreal bog environment,» *AIMS Microbiology*, vol. 3, nº 4, pp. 789-814, 2017.
- [15] M. Lazard, S. Blanquet, P. Fiscaro, G. Labarraque y Pierre, «Uptake of selenite by *Saccharomyces cerevisiae* involves the high and low affinity orthophosphate transporters,» *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 32029-37, 2016.
- [16] J. R. McDermott, B. P. Rosen y Z. Liu, «Jen1p: A High Affinity Selenite Transporter in Yeast,» *Mol Biol Cell*, vol. 21, pp. 3934-41, 2010.
- [17] L. Zhang, B. Hu, W. Li, R. Che, K. Deng, H. Li, F. Yu, H. Ling, Y. Li y C. Chu, «OsPT2, a phosphate transporter, is involved in the active uptake of selenite in rice,» *New Phytol*, vol. 201, nº 4, pp. 1183-91, 2014.
- [18] X. Q. Zhao, N. Mitani, N. Yamaji, R. F. Shen y J. F. Ma, «Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice,» *Plant Physiol*, vol. 153, nº 4, pp. 1871-77, 2010.
- [19] J. McDermott, Z. Geng, L. Jiang, M. Gálvez-Peralta, F. Chen, D. W. Nebert y Z. Liu, «Zinc- and bicarbonate-dependent ZIP8 transporter mediates selenite uptake,» *Oncotarget*, vol. 7, nº 23, pp. 35327-40, 2016.
- [20] X. Geng, J. McDermott, J. Lundgren, L. Liu, K.-J. Tsai, J. Shen y Z. Liu, «Role of AQP9 in transport of monomethylselenic acid and selenite,» *Biometals*, vol. 30, nº 5, pp. 747-755, 2017.
- [21] M. Bjornstedet, S. Kumar y A. Holmgren, «Selenodiglutathione Is a Highly Efficient Oxidant of Reduced Thioredoxin and a Substrate for Mammalian Thioredoxin Reductase,» vol. 267, nº 80330-8035, 1992.
- [22] M. Birringer, S. Pilawab y L. Flohe, «Trends in selenium biochemistry,» *Nat. Prod. Rep*, vol. 19, nº 6, pp. 693-718, 2002.
- [23] S. Kumar, M. Bjornstedt y A. Holmgren, «Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen,» vol. 207, nº 435-439, 1992.
- [24] M. Roman, P. Jitaru y C. Barbante, «Selenium biochemistry and its role for human health,» *Metallomics*, vol. 6, nº 1, pp. 25-54, 2014.
- [25] I. o. M. (US), «Selenium,» de *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*, Washington DC, National Academies Press (US), 2000.
- [26] K. Suzuki, «Metabolomics of Selenium: Se Metabolites Based on Speciation Studies,» *J. Heal. Sci.*, vol. 51, pp. 107-114, 2005.

- [27] T. Okuno, H. Ueno y K. Nakamuro, «Cystathionine gamma-lyase contributes to selenomethionine detoxification and cytosolic glutathione peroxidase biosynthesis in mouse liver,» *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 109, pp. 155-11, 2006.
- [28] M. Roman, P. Jitaru y C. Barbante, «Selenium biochemistry and its role for human health,» *Metallomics*, vol. 6, nº 1, pp. 25-54, 2014.
- [29] Y. Ogra y Y. Anan, «Selenometabolomics: Identification of selenometabolites and specification of their biological significance by complementary use of elemental and molecular mass spectrometry,» *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 24, nº 11, pp. 1477-88, 2009.
- [30] N. Terry, A. M. Zayed, M. P. Souza y A. S. Tarum , «Selenium in Higher Plants,» *Annual Review of Plant Biology*, vol. 51, pp. 401-432, 2000.
- [31] W.-M. Ching, B. Alzber-Deweedy y T. Stadtman, «A selenium-containing nucleoside at the first position of the anticodon in seleno-tRNAGlu from *Clostridium sticklandii*,» vol. 82, nº 347-350, 1985.
- [32] V. Gladyshev, S. Khangulov y T. Stadtman, «Nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barked*: Electron paramagnetic resonance studies show that selenium is coordinated with molybdenum in the catalytically active selenium-dependent enzyme,» vol. 91, nº 232-236, 1994.
- [33] T. Kitajima y Y. Chiba, «Selenomethionine metabolism and its toxicity in yeast,» *BioMol Concepts*, vol. 4, nº 6, pp. 611-616, 2013.
- [34] E. S. Arnér, «What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine?,» *Exp. Cell Res.*, vol. 361, pp. 1296-1303, 2010.
- [35] R. L. Hondal, S. M. Marino y V. N. Gladyshev, «Selenocysteine in Thiol/Disulfide-Like Exchange Reactions,» *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 18, nº 13, pp. 1675-1689, 2013.
- [36] R. J. Hondal y E. L. Ruggles, «Differing views of the role of selenium in hioredoxin reductase,» *Amino Acids*, vol. 41, pp. 73-89, 2011.
- [37] G. V. Kryukov, «Characterization of Mammalian Selenoproteomes,» vol. 300, nº 5624, 2003.
- [38] M. P. Rayman, «The importance of selenium to human health,» vol. 356, 2000.
- [39] L. Flohe, W. A. Gunzler y H. H. Schoch, «Glutathione peroxidase: a selenoenzyme,» vol. 32, nº 132 - 134, 1973.
- [40] A. Lobanov, D. Hatfield y V. Gladyshev, «Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes,» vol. 1790, nº 1424-1428, 2009.
- [41] A. K. Corsi, B. Wightman y M. Chalfie, «A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*,» vol. 200, nº 387-407, 2015.

- [42] L. Frézal y M.-A. Féliz, «C. elegans outside the Petri dish,» nº 1-14, 2015.
- [43] D. Raizen, J. Zimmerman, M. Maycock, U. Ta, Y.-J. You, M. V. Sundaram y A. Pack, «Lethargus is a Caenorhabditis elegans sleep-like state,» vol. 451, nº 569 - 572, 2008.
- [44] A. R. Frand y G. C. Monsalve, «Forward a unified model of developmental timing - a molting approach,» vol. 1, nº 221-230, 2012.
- [45] T. Stiernagle, «Maintenance of C. elegans,» nº 1-11, 2006.
- [46] S. Brenner, «The genetics of Caenorhabditis elegans,» vol. 77, nº 1, pp. 71-94, 1974.
- [47] A. K. Corsi, B. Wightman y M. Chalfie, «A transparent window into biology: A primer on Caenorhabditis elegans,» 2015.
- [48] Z. F. Altun y D. H. Hall, «Introduction,» *WormAtlas*, 2009.
- [49] R. Lints y D. H. Hall, «Male Introduction,» de *WormAtlas*, 2009.
- [50] L. Romanelli-Cedr ez, M. Doltsidou, M. J. Alkema y G. Salinas, «HIF-1 has a central role in Caenorhabditis elegans organismal response to selenium,» vol. 11:63, 2020.
- [51] A. Epstein y et. al. , «C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation,» vol. 107, nº 43-54, 2001.
- [52] T. L. Nguyen y R. Dur an, «Prolyl hydroxylase domain enzymes and their role in cell signaling and cancer metabolism.,» vol. 80, nº 71-80, 2016.
- [53] Z. Shao, Y. Zhanh y A. Powell-Coffman, «Two Distinct Roles for EGL-9 in the Regulation of HIF-1-Mediated Gene Expression in Caenorhabditis elegans,» vol. 183(3), nº 821-829, 2009.
- [54] N. A. Smirnova, D. M. Hushpulia y R. E. Speer, «Catalytic Mechanism and Substrate Specificity of HIF Prolyl Hydroxylases,» *Biochemistry (Moscow)*, vol. 77, nº 10, pp. 1108-1119, 2012.
- [55] A. I. Osipyants, A. A. Poloznikov, N. A. Smirnova, D. A. Hushpulia, A. Khristichenko, T. A. Chubar,, A. A. Zakhariants, M. Ahuja, I. N. Gaisina, B. Thomas, A. M. Brown, I. G. Gazaryan y V. I. Tishkov, «L-ascorbic acid: a true substrate for HIF proly hydroxylase?,» *Biochimie*, pp. 46-54, 2018.
- [56] M. W. Budde y M. B. Roth, «The response of caenorhabditis elegans to Hydrogen Sulfide and Hydrogen Cyanide,» vol. 189, nº 521-532, 2011.
- [57] M. W. Budde y M. B. Roth, «Hydrogen Sulfide Increases Hypoxia-inducible Factor-1 Activity Independently of von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-1 in C. elegans,» vol. 21, nº 4042-4056, 2010.

- [58] M. Filipovic, J. Zivanovic, B. Alvarez y R. Banerjee, «Chemical Biology of H<sub>2</sub>S Signaling through Persulfidation,» vol. 118, nº 1253-1337, 2018.
- [59] D. K. Ma, R. Vozdek, N. Bhatla y H. R. Horvitz, «CYSL-1 interacts with the O<sub>2</sub>-sensing hydroxylase EGL-9 to promote H<sub>2</sub>S-modulated hypoxia-induced behavioral plasticity in *C. elegans*,» vol. 73, nº 925-940, 2012.
- [60] D. L. Miller, M. W. Budde y M. B. Roth , «HIF-1 and SKN-1 Coordinate the Transcriptional Response to Hydrogen Sulfide in *Caenorhabditis elegans*,» vol. 6, nº e25476, 2011.
- [61] A. M. Raines y R. A. Sunde, «Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents.,» vol. 12, nº 26, 2011.
- [62] W. H. Li, C. H. Chang, C. W. Huang, C. C. Wei y V. C. Liao, «Selenite Enhances Immune Response against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 via SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*,» vol. 9 (8), nº e105810, 2014.
- [63] W. H. Li , Y. C. Shi, C. H. Chang, C. W. Huang y V. Hisu-Chaun Liao, «Selenite protects *Caenorhabditis elegans* from oxidative stress via DAF-16 and TRXT-1,» vol. 58, nº 863-874, 2014.
- [64] W. Wood, *The Nematode Caenorhabditis elegans*, Boulder: Cold Spring Harbor Monograph Series, 1988.
- [65] A. D. Edelstein, M. A. Tsuchida, N. Amodaj, H. Pinkard, R. D. Vale y N. Stuurman, «Advanced methods of microscope control using µManager software,» *Journal of Biological Methods*, vol. 1, nº 2, p. e11 , 2014.
- [66] C. D. Rueden, J. Schindelin, M. C. Hiner y et al, «ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data,» *BMC Bioinformatics*, vol. 18, nº 529, 2017.
- [67] C. Trent, N. Tsuing y H. R. Horvitz, «Egg-laying defective mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*,» vol. 104 (4), nº 619-47, 1983.
- [68] K. Yook, «Complementation,» de *Wormbook*, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, 2005.
- [69] K. L. Tucker, R. J. Cousins, B. Caballero, A. C. Ross y T. R. Ziegler, *Modern nutrition in health and disease*. Eleventh edition, Wolters Kluwer Health Adis (ESP), 2012.
- [70] V. Labaunskyy, D. Hatfield y V. Gladyshev, «Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles,» vol. 94, 2014.
- [71] A. C. Ross, B. Caballero, R. J. Cousins, K. Tucker y T. R. Zigler, *Modern nutrition in health and disease*. Eleventh edition, Wolters Kluwer Health Adis (ESP), 2012.



## 6 Anexo

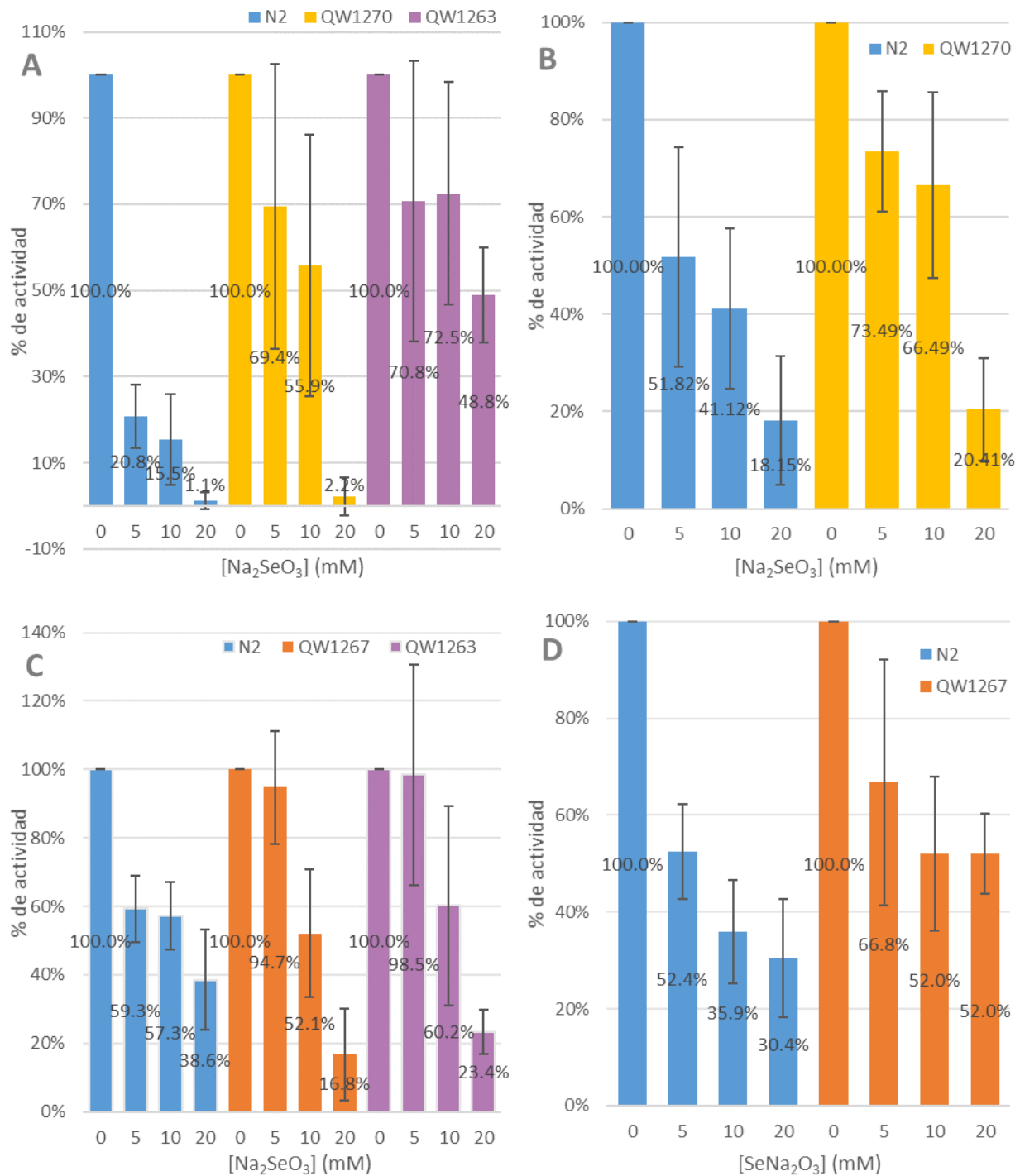
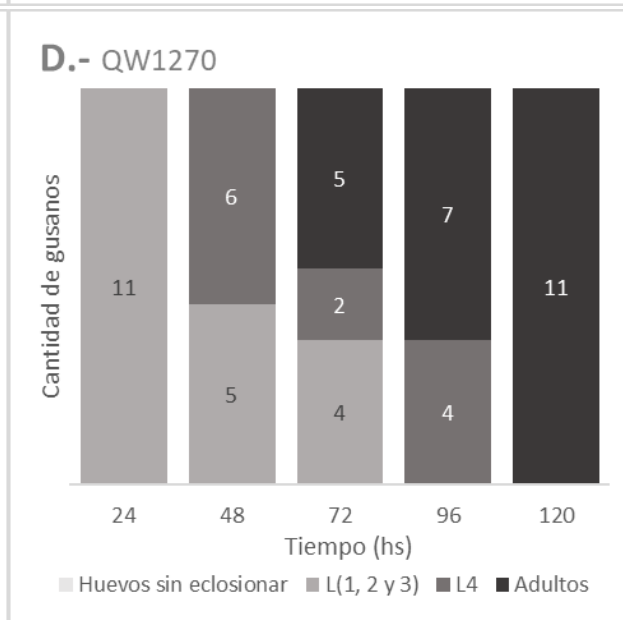
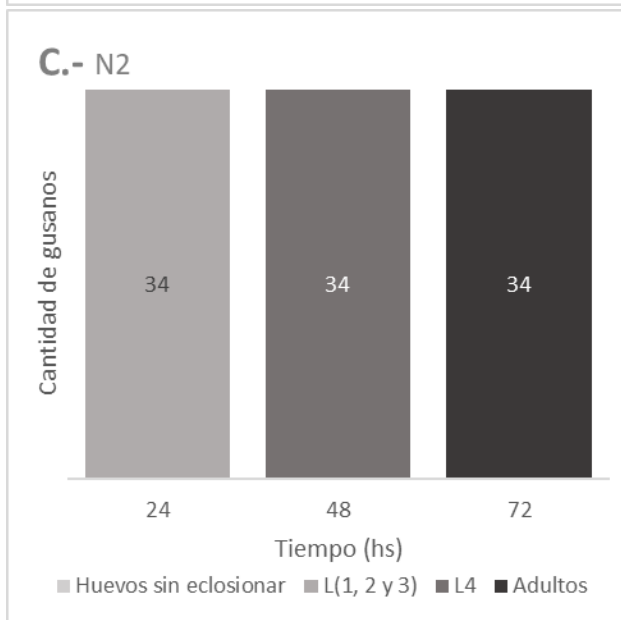
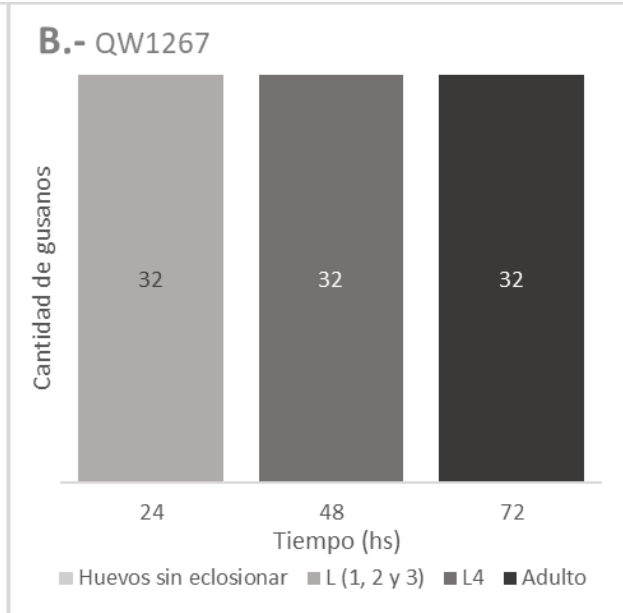
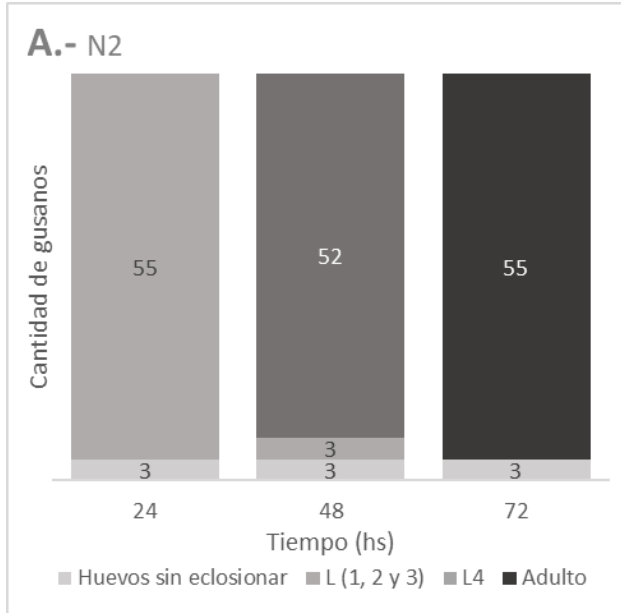


Figura S 1: Réplicas de resistencia a selenio en medio líquido. (A) y (B) Resistencia del mutante QW1270; (C) y (D) resistencia del mutante QW1267. Ambas estirpes fueron sincronizadas y evaluadas en el estadio larvario L4, utilizando el equipo WMicroTracker y a concentraciones de 0, 5, 10 y 20 mM de selenito de sodio. En la imagen se ve el porcentaje de actividad utilizando la concentración 0 mM como referencia. Los resultados mostrados son producto de una incubación de 900 minutos en las condiciones dadas a temperatura ambiente. Los ensayos mostrados en (B) y (D) fueron realizados sin un control positivo de resistencia a Se.





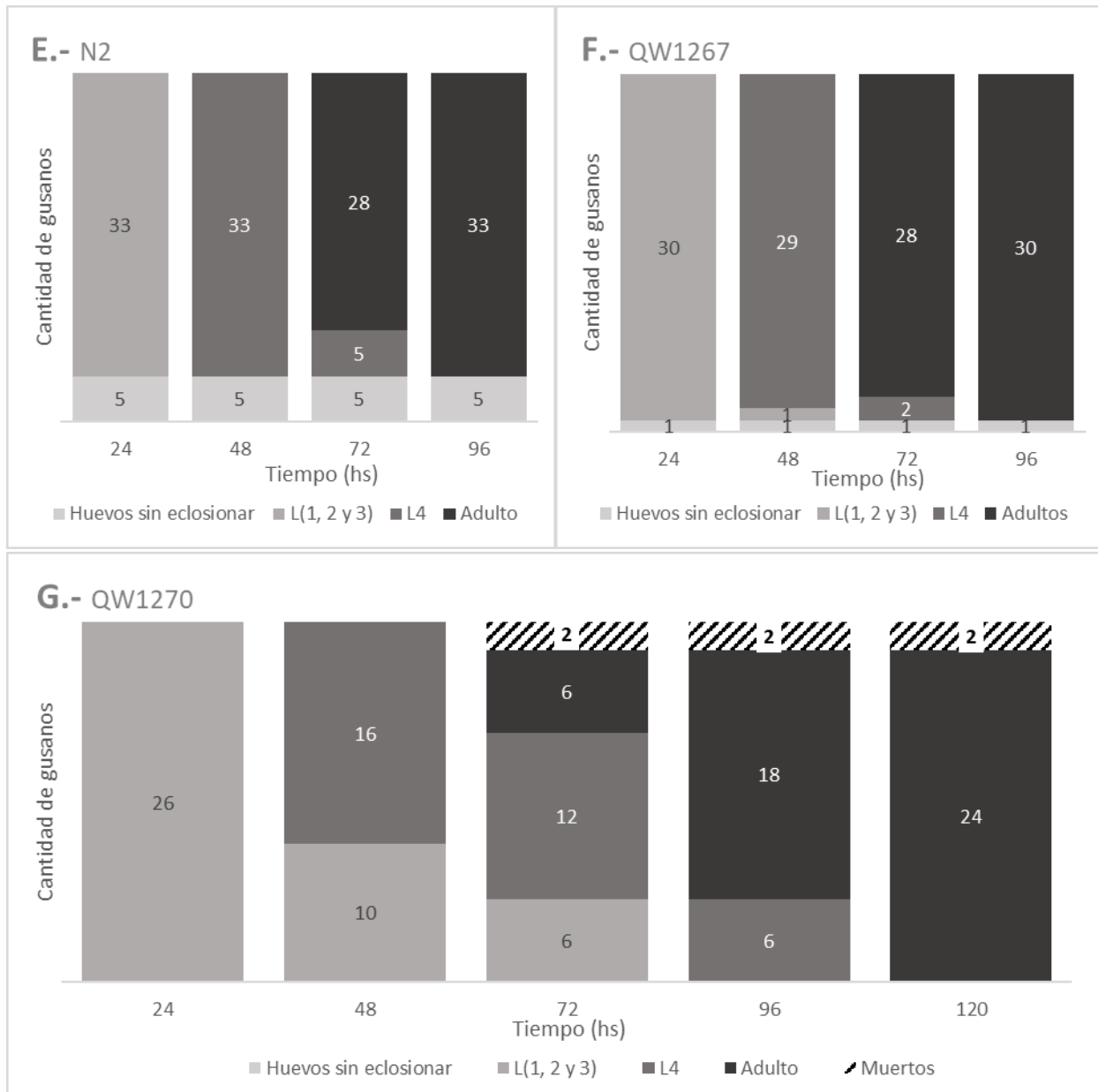


Figura S 2: Réplicas de ensayo de desarrollo post-embionario de las estirpes QW1270 y QW1267. En las figuras (A) y (B) se cuantificó la cantidad de gusanos en diferentes estadios del desarrollo de N2 y QW1267, respectivamente. En (C) y (D) la cantidad de gusanos en diferentes estadios del desarrollo de N2 y QW1270, respectivamente. Por último en (E), (F) y (D) se cuantificó la cantidad de gusanos en cada estadio del desarrollo de las tres estirpes: N2, QW1267 y QW1270, respectivamente. Las placas con medio NGM y alimento se incubaron a 20°C y se observaron cada 24hs.

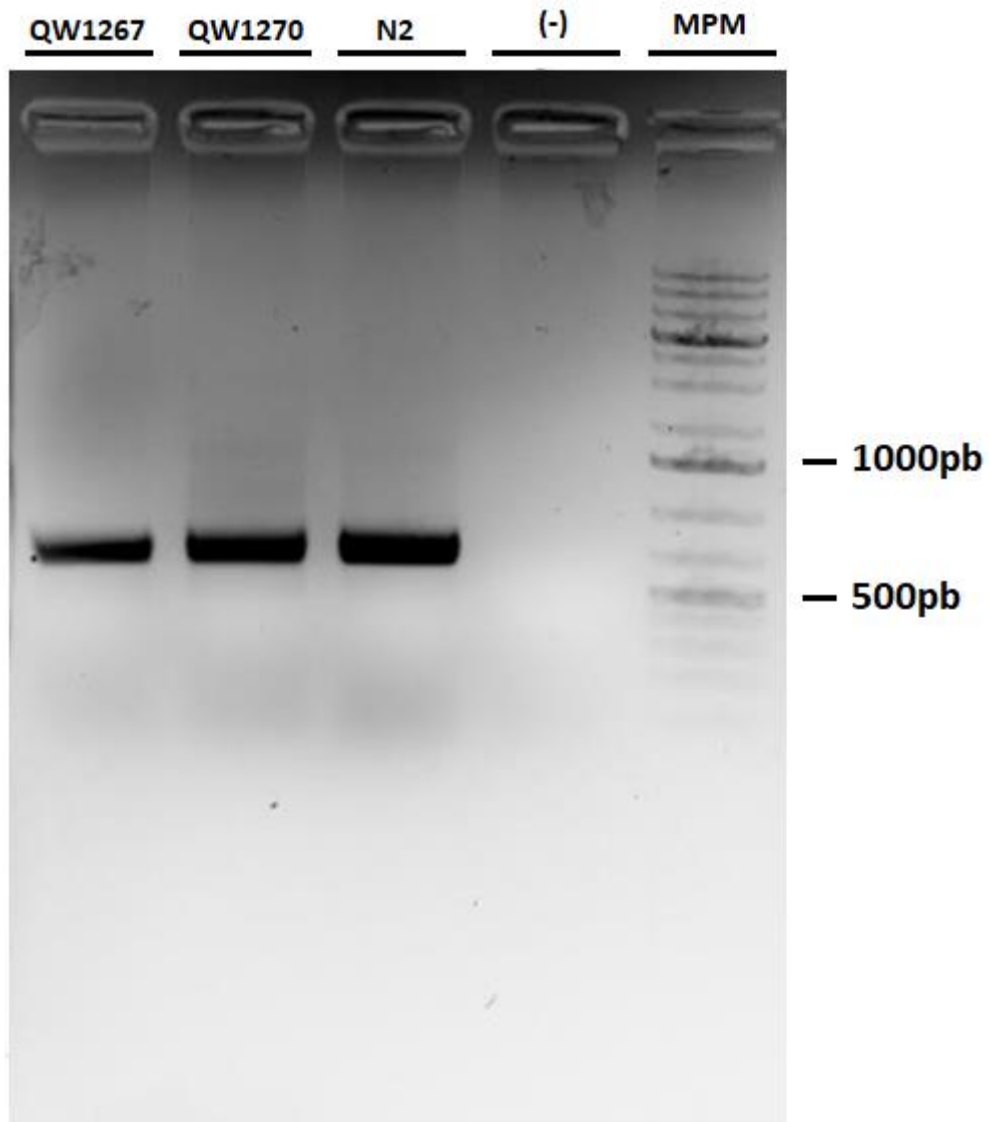


Figura S 3: Electroforesis de gel de agarosa 2% con los productos de amplificación de PCR realizada utilizando primers diseñados para contener la región que codifica para la histidina 487 del gen *egl-9*.

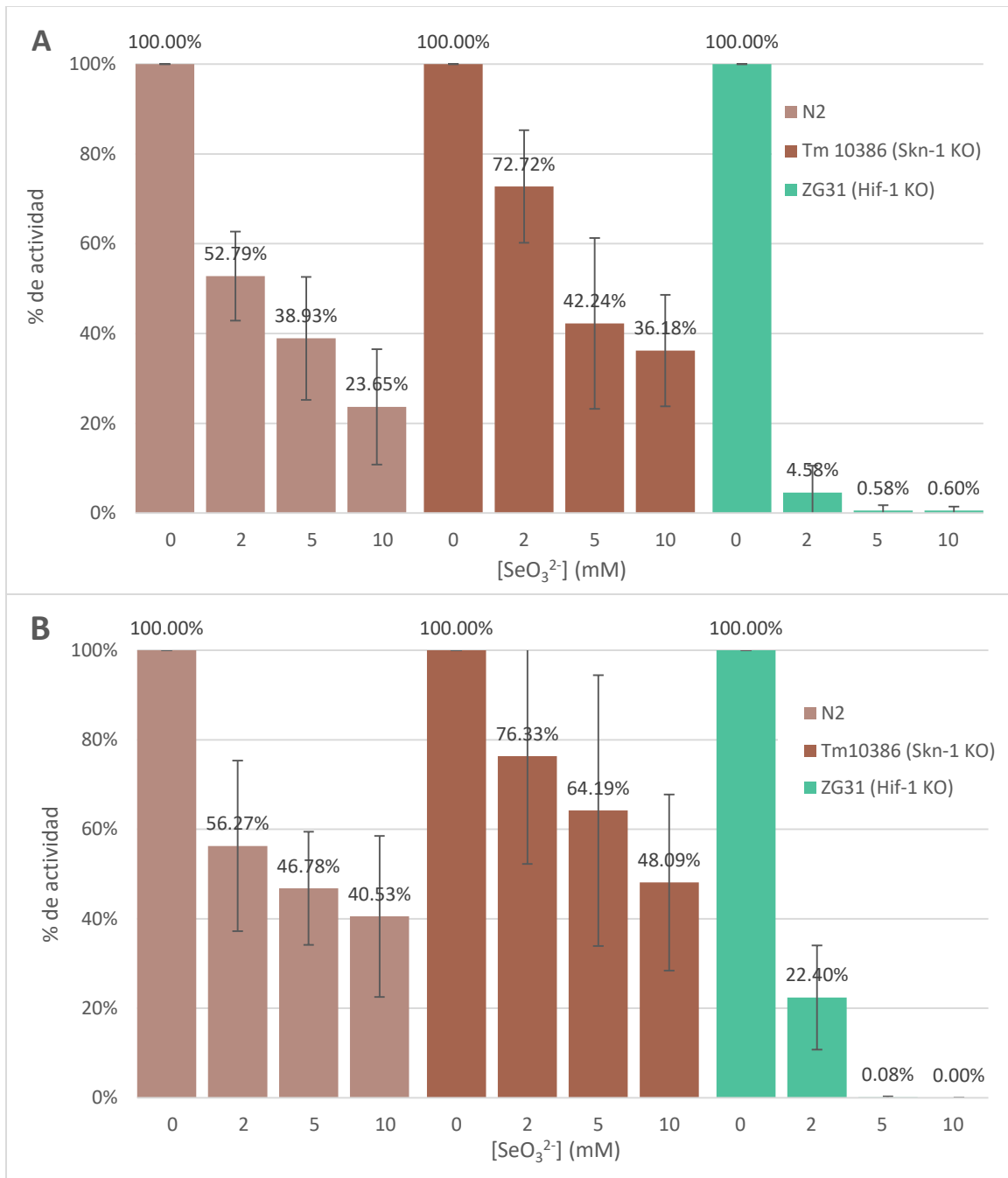


Figura S 4: Réplicas de resistencia a selenito de sodio en medio líquido del mutante TM10386. Las figuras (A) y (B) muestran los datos de dos ensayos diferentes. Los gusanos fueron sincronizados y evaluados en el estadio larvario L4, utilizando el equipo WMicroTracker y a concentraciones de 0, 2, 5 y 10 mM de selenito de sodio. En la imagen se ve el porcentaje de actividad utilizando la concentración 0 mM como referencia. Los resultados mostrados son producto de una incubación de 900 minutos en las condiciones dadas a temperatura ambiente.