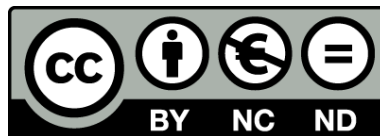




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Hidroxianèleg de la selenometionina com a font
de seleni en cèl·lules intestinals Caco-2 i en macròfags:
expressió de selenoproteïnes i modulació de l'estrès
oxidatiu i de la producció de citocines**

Joan Campo Sabariz



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

Hidroxianàleg de la selenometionina com a font de seleni en cèl·lules intestinals Caco-2 i en macròfags: expressió de selenoproteïnes i modulació de l'estrès oxidatiu i de la producció de citocines

Joan Campo Sabariz

2022



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
Departament de Bioquímica i Fisiologia

PROGRAMA DE DOCTORAT:
Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

Hidroxianèleg de la selenometionina com a font de seleni en cèl·lules intestinals Caco-2 i en macròfags: expressió de selenoproteïnes i modulació de l'estrès oxidatiu i de la producció de citocines.

Memòria presentada per **Joan Campo Sabariz** per optar al títol de Doctor per la Universitat de Barcelona

Dra. Raquel Martin Venegas
(directora)

Dra. Ruth Ferrer Roig
(directora)

Joan Campo Sabariz
(doctorand)

Joan Campo Sabariz
2022

Aquesta tesi ha estat subvencionada pels projectes FBG-308920 i FBG-310270 de la *Fundació Bosch i Gimpera* i *Adisseo France SAS*. Durant la seva realització, l'autor ha gaudit d'un ajut del *Programa de contractació d'investigadors predoctorals UB (PREDOCS-UB)* (2019-2020).



RESUM
ABSTRACT

El Se és un micronutrient essencial que participa en diferents funcions en humans i en animals a través de la seva incorporació en forma de selenocisteïna (Sec) a les selenoproteïnes. Una ingesta inadequada de Se es considera un factor de risc per diverses malalties cròniques associades a l'estrès oxidatiu i a la inflamació. La seva incorporació com a additiu en les dietes d'aviram és una manera efectiva de disminuir els efectes negatius de l'estrès que pateixen els animals degut a l'increment en els paràmetres de producció de la indústria avícola.

En el present estudi s'ha investigat el paper de l'hidroxianàleg de la selenometionina (àcid 2-hidroxi-4-metilselenobutanoic, HMSeBA), una font orgànica de Se, per donar suport a la síntesi de selenoproteïnes i a la protecció davant l'estrès oxidatiu, en dues línies cel·lulars: cèl·lules intestinals Caco-2 i macròfags (derivats de monòcits humans THP-1). El paper de l'HMSeBA en la resposta inflamatòria dels macròfags també s'ha estudiat.

Per estudiar els efectes de la deficiència de Se, es va desenvolupar un model de privació de Se en ambdues línies cel·lulars. L'estudi va prosseguir amb l'avaluació dels efectes de la suplementació amb aquesta font orgànica de Se. En aquests dos models, es va estudiar la capacitat de l'HMSeBA sobre l'expressió de selenoproteïnes com la glutatió-peroxidasa (GPX), la tioredoxina-reductasa (TXNRD) o la selenoproteïna P1 (SELENOP). A més, també es va estudiar la capacitat antioxidant de l'HMSeBA en cèl·lules estimulades amb H₂O₂, amb *Salmonella* Enteritidis o amb lipopolisacàrid (LPS), a través de la determinació de les espècies reactives d'oxigen (ROS), la formació de productes secundaris d'oxidació i l'autofluorescència de les cèl·lules. Per tal d'estudiar el paper de l'HMSeBA en la resposta inflamatòria, es va determinar la producció de citocines i la capacitat fagocítica i bactericida dels macròfags.

En cèl·lules Caco-2, l'activitat GPX i l'expressió gènica de GPX1 juntament amb l'expressió tant proteica com gènica de SELENOP van disminuir significativament en el model de privació de Se, mentre que l'expressió gènica de GPX2 i la producció de ROS van incrementar. No es van observar canvis en l'activitat TXNRD. Quan les cèl·lules es van suplementar amb HMSeBA, l'activitat GPX i TXNRD, l'expressió gènica

de GPX1 i GPX2 i l'expressió tant proteica com gènica de SELENOP van incrementar significativament. De manera similar, després de l'estimulació amb H₂O₂ o *Salmonella* Enteritidis, es va observar una disminució en la producció de ROS, en la peroxidació lipídica i en la carbonilació proteica amb l'addició d'HMSeBA. En macròfags, la privació de Se va induir una reducció de l'activitat GPX, de l'expressió gènica de GPX1 i de l'expressió tant proteica com gènica de SELENOP. La suplementació amb HMSeBA va incrementar l'expressió gènica de GPX1 i de SELENOP i va ser capaç de reduir la producció de ROS després de l'estimulació amb H₂O₂. En cèl·lules estimulades amb LPS, l'HMSeBA va incrementar l'expressió gènica de GPX1 i va reduir l'estrès oxidatiu així com la producció de citocines. La capacitat fagocítica i bactericida van incrementar també amb aquesta font de Se.

Les cèl·lules Caco-2 i els macròfags poden utilitzar HMSeBA com a font de Se per la síntesi de selenoproteïnes, protegint la cèl·lula de l'estrès oxidatiu. A més, l'HMSeBA modula positivament la resposta inflamatòria per tal d'evitar el possible dany produït per macròfags altament activats.

Se is an essential micronutrient which plays a role in different functions in humans and animals through its incorporation into selenoproteins as selenocysteine (Sec). Inadequate dietary Se is considered a risk factor for several chronic diseases associated with oxidative stress and inflammation. Its incorporation as a supplement in poultry diets has become an effective way to diminish the negative effects of the stress caused to animals due to the increase in production parameters in poultry industry.

The present study has investigated the role of the hydroxy-selenomethionine analogue (2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid, HMSeBA), an organic form of Se, in supporting selenoprotein synthesis and protecting against oxidative stress in two cell lines: intestinal Caco-2 cells and macrophages (derived THP-1 human monocytes). HMSeBA role in inflammatory response has also been studied in macrophages.

To study the effects of Se deficiency in cells, a model of Se deprivation was developed in both cell lines. The study was then moved forward to evaluate the effects of this organic Se source in a model of Se supplementation. In these two models, HMSeBA capacity to support selenoprotein synthesis, such as glutathione peroxidase (GPX), thioredoxin reductase (TXNRD) or selenoprotein P1 (SELENOP), was studied. Moreover, HMSeBA antioxidant capacity was also studied in cells stimulated with H₂O₂, *Salmonella* Enteritidis or lipopolysaccharide (LPS), by determining reactive oxygen species (ROS) production, secondary oxidation products and cell autofluorescence. To study the role of HMSeBA in inflammatory response, cytokine production as well as phagocytic and killing capacity from macrophages were also studied.

In Caco-2 cells, GPX activity and GPX1 gene expression together with both protein and gene expression of SELENOP in the Se-deprived model were significantly decreased, while GPX2 gene expression and ROS production were significantly increased. There were no effects in TXNRD activity. When cells were supplemented with HMSeBA, GPX and TXNRD activity, GPX1 and GPX2 gene expression and both SELENOP gene and protein expression were significantly increased. Similarly, a decrease in ROS, lipid

peroxidation and protein carbonylation after H₂O₂ or *Salmonella* Enteritidis treatment and the addition of HMSeBA were observed. In macrophages, Se deprivation induced a reduction in GPX activity, GPX1 gene expression and both SELENOP protein and gene expression. HMSeBA supplementation upregulated gene expression of GPX1 and SELENOP and was capable of decreasing ROS production after H₂O₂ treatment. In LPS-stimulated macrophages, HMSeBA upregulated GPX1 gene expression and reduced oxidative stress and cytokine production. Phagocytic and killing capacity were enhanced by this Se source.

Caco-2 cells and macrophages can use HMSeBA as a Se source for selenoprotein synthesis, resulting in protection against oxidative stress. Moreover, HMSeBA positively modulates the inflammatory response to avoid the potential toxic insult produced by highly activated macrophages.

ÍNDIX

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Cicle del seleni a la cadena alimentària	3
1.2. Se en la nutrició d'aviram	5
1.2.1. Suplements nutricionals de Se en aviram	6
1.2.2. Fonts de Se utilitzades en nutrició animal	7
1.2.2.1. Selenit de sodi	8
1.2.2.2. Selenometionina.....	8
1.2.2.3. Hidroxianàleg de la Se-Met.....	9
1.3. Absorció i metabolisme de les diferents fonts de Se	10
1.3.1. Absorció	10
1.3.2. Metabolisme	11
1.3.3. Excreció del Se	13
1.4. Selenoproteïnes	15
1.4.1. Síntesi de selenoproteïnes	15
1.4.2. Distribució i funció de les selenoproteïnes.....	17
1.4.2.1. Glutació peroxidasa.....	18
1.4.2.2. Tioredoxina reductasa	20
1.4.2.3. Selenoproteïna P1	21
1.4.3. Jerarquia de les selenoproteïnes	22
1.5. Se i salut	23
1.5.1. Sistemes de defensa contra l'estrès oxidatiu	23
1.5.2. Se i salut intestinal.....	23
1.5.3. Se i sistema immunitari intestinal	25
1.5.3.1. Macròfags.....	27
2. OBJECTIUS	29
3. MATERIALS I MÈTODES	35
3.1. Estudi en cèl·lules intestinals Caco-2	37
3.1.1. Materials	37

3.1.2. Cultiu de cèl·lules Caco-2	37
3.1.3. Ressembrada de cèl·lules Caco-2	38
3.1.4. Composició dels medis de cultiu de cèl·lules Caco-2.....	38
3.1.5. Model de privació de Se en cèl·lules Caco-2	39
3.1.6. Model de suplementació amb Se en cèl·lules Caco-2.....	40
3.1.7. Model d'estimulació amb H ₂ O ₂ en cèl·lules Caco-2	41
3.1.8. Model d'estimulació amb <i>Salmonella</i> Enteritidis en cèl·lules Caco-2.....	42
3.1.9. Determinació de l'activitat GPX i TXNRD, expressió proteica de SELENOP i expressió gènica de SELENOP, GPX1 i GPX2 en cèl·lules Caco-2.....	43
3.1.9.1. Obtenció de les mostres.....	43
3.1.9.2. Determinació de l'activitat GPX.....	43
3.1.9.3. Determinació de l'activitat TXNRD	44
3.1.9.4. Determinació de l'expressió proteica de SELENOP	44
3.1.9.5. Determinació de l'expressió gènica de SELENOP, GPX1 i GPX2.....	45
3.1.10. Determinació de la producció de ROS intracel·lulars en cèl·lules Caco-2	46
3.1.11. Determinació de la carbonilació proteica i de la formació d'adductes hidroxinenals en cèl·lules Caco-2	47
3.1.11.1. Obtenció de les mostres.....	47
3.1.11.2. Determinació de la carbonilació proteica	48
3.1.11.3. Determinació de la formació d'adductes hidroxinenals	49
3.1.12. Determinació de concentració de proteïnes en cèl·lules Caco-2	49
3.1.13. Determinació de la viabilitat de <i>Salmonella</i> Enteritidis	50
3.1.14. Anàlisi estadística.....	50
3.2. Estudi en macròfags derivats de monòcits THP-1.....	51
3.2.1. Materials	51
3.2.2. Cultiu de cèl·lules THP-1.....	51

3.2.3. Obtenció de macròfags	51
3.2.4. Composició dels medis de cultiu de macròfags.....	52
3.2.5. Model de privació de Se en macròfags.....	53
3.2.6. Model de suplementació amb Se en macròfags	54
3.2.7. Model d'estimulació amb H ₂ O ₂ en macròfags.....	54
3.2.8. Model d'estimulació amb LPS en macròfags	55
3.2.9. Determinació de l'activitat GPX, expressió proteica de SELENOP i expressió gènica de SELENOP i GPX1 en macròfags.....	56
3.2.9.1. Obtenció de les mostres	56
3.2.9.2. Determinació de l'activitat GPX i expressió proteica de SELENOP.....	56
3.2.9.3. Determinació de l'expressió gènica de SELENOP i GPX1.....	57
3.2.10. Determinació de la producció de ROS intracel·lulars en macròfags.....	57
3.2.11. Determinació de l'autofluorescència en macròfags.....	57
3.2.12. Determinació de la producció de citocines TNF α , IL-1 β i IL-10 en macròfags	58
3.2.13. Determinació de la capacitat fagocítica i bactericida en macròfags.....	58
3.2.14. Anàlisi estadística.....	59
4. RESULTATS	61
4.1. Estudi en cèl·lules intestinals Caco-2.....	63
4.1.1. Model de privació de Se en cèl·lules Caco-2	63
4.1.2. Model de suplementació amb Se en cèl·lules Caco-2.....	66
4.1.3. Model d'estimulació amb H ₂ O ₂ en cèl·lules Caco-2	71
4.1.4. Model d'estimulació amb <i>Salmonella</i> Enteritidis en cèl·lules Caco-2	73
4.1.5. Viabilitat de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	73
4.2. Estudi en macròfags derivats de monòcits THP-1.....	74
4.2.1. Model de privació de Se en macròfags.....	74

4.2.2. Model de suplementació amb Se en macròfags	78
4.2.3. Model d'estimulació amb H ₂ O ₂ en macròfags	79
4.2.4. Model d'estimulació amb LPS en macròfags	80
5. DISCUSSIÓ	91
6. CONCLUSIONS	105
6.1. Estudi en cèl·lules intestinals Caco-2	107
6.2. Estudi en macròfags derivats de monòcits THP-1	109
7. BIBLIOGRAFIA	115
8. ANNEX 1	139

Campo-Sabariz J, Moral-Anter D, Brufau MT, Briens M, Pinloche E, Ferrer R, Martín-Venegas R. 2-Hydroxy-(4-methylseleno)butanoic Acid Is Used by Intestinal Caco-2 Cells as a Source of Selenium and Protects against Oxidative Stress. *J Nutr.* 2019;149:2191-2198. doi: 10.1093/jn/nxz190.

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Fórmula i estructura química del selenit de sodi	8
Figura 2. Fórmula i estructura química de la selenometionina	9
Figura 3. Estructura química de la metionina i la selenometionina i dels seus respectius hidroxianàlegs	10
Figura 4. Esquema del metabolisme del Se.....	14
Figura 5. Incorporació de la Sec a la síntesi de selenoproteïnes	16
Figura 6. Estructura dels elements SECIS de diverses selenoproteïnes	17
Figura 7. Esquema del mecanisme catalític de l'enzim glutatió peroxidasa	19
Figura 8. Esquema del flux d'electrons del sistema TXNRD-Trx	20
Figura 9. Estructura de la paret intestinal	24
Figura 10. Esquema dels suports utilitzats per la ressebra de les cèl·lules Caco-2.....	38
Figura 11. Disseny experimental del model de privació de Se en cèl·lules Caco- 2.	39
Figura 12. Fonament de la determinació de l'activitat LDH.....	40
Figura 13. Disseny experimental del model de suplementació de Se en cèl·lules Caco-2.....	41
Figura 14. Disseny experimental del model d'estimulació amb H ₂ O ₂ en cèl·lules Caco-2.....	41
Figura 15. Disseny experimental del model d'estimulació amb <i>Salmonella</i> Enteritidis en cèl·lules Caco-2.....	42
Figura 16. Fonament de la determinació de l'activitat GPX.	44
Figura 17. Fonament de la determinació de l'activitat TXNRD.....	44
Figura 18. Fonament de la determinació de ROS.....	47
Figura 19. Fonament de la determinació de la carbonilació proteica.....	48
Figura 20. Fonament de la determinació d'adductes 4-HNE	49
Figura 21. Esquema dels diferents suports utilitzats per a l'obtenció de macròfags.....	52

Figura 22. Disseny experimental del model de privació de Se en macròfags.....	53
Figura 23. Disseny experimental del model de suplementació amb Se en macròfags.....	54
Figura 24. Disseny experimental del model d'estimulació amb H2O2 en macròfags.....	54
Figura 25. Disseny experimental del model d'estimulació amb LPS.....	55
Figura 26. Activitat LDH en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control o en medi sense Se	63
Figura 27. Activitat GPX, expressió gènica relativa de GPX1, expressió gènica relativa de GPX2, expressió proteica de SELENOP, expressió gènica relativa de SELENOP i activitat TXNRD en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control o en medi sense Se	64
Figura 28. Expressió gènica relativa de SELENOP, GPX1 i GPX2 en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control.....	65
Figura 29. Producció de ROS en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control i medi sense Se	65
Figura 30. Activitat LDH al medi de cultiu de cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control o en medi suplementat amb Se	67
Figura 31. Activitat GPX en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se o en medi suplementat amb Se.....	68
Figura 32. Expressió gènica relativa de GPX1 i GPX 2 en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se o en medi suplementat amb Se	69
Figura 33. Expressió proteica de SELENOP en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se o en medi suplementat amb Se.....	70
Figura 34. Expressió gènica relativa de SELENOP en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se o en medi suplementat amb Se	71
Figura 35. Producció de ROS, producció d'adductes 4-HNE i producció de carbonilacions proteiques en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se o en medi suplementat amb Se.....	72

Figura 36. Producció de ROS en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se o en medi suplementat amb Se i estimulades amb <i>Salmonella</i> Enteritidis	73
Figura 37. Nombre d'UFC de <i>Salmonella</i> Enteritidis en absència o presència d'HMSeBA.....	74
Figura 38. Activitat LDH en macròfags sembrats en medi control o en medi sense Se.....	75
Figura 39. Activitat GPX, expressió gènica relativa de GPX1, expressió proteica de SELENOP i expressió gènica relativa de SELENOP en macròfags sembrats en medi control o medi sense Se	76
Figura 40. Expressió gènica relativa de SELENOP i GPX1 en macròfags sembrats en medi control	77
Figura 41. Producció de ROS en macròfags sembrats en medi control o medi sense Se.....	77
Figura 42. Expressió gènica relativa de GPX1 i expressió gènica relativa de SELENOP en macròfags mantinguts en medi sense Se, en medi suplementat amb Se o en medi control.....	79
Figura 43. Producció de ROS en macròfags mantinguts en medi sense Se o en medi suplementat amb Se i estimulats amb H ₂ O ₂	80
Figura 44. Expressió gènica relativa de GPX1 i producció de ROS en macròfags mantinguts en medi sense Se i estimulats amb LPS	81
Figura 45. Expressió gènica relativa de GPX1 i producció de ROS en macròfags mantinguts en medi control i estimulats amb LPS.....	82
Figura 46. Expressió gènica relativa de GPX1 en macròfags mantinguts en medi sense Se, medi control, medi suplementat amb Se o medi control suplementat amb Se i estimulats amb LPS.....	84
Figura 47. Producció de ROS en macròfags mantinguts en medi sense Se, medi control, medi suplementat amb Se o medi control suplementat amb Se i estimulats amb LPS	86

Figura 48. Autofluorescència en macròfags mantinguts en medi sense Se, medi control, medi suplementat amb Se o medi control suplementat amb Se i estimulats amb LPS	87
Figura 49. Producció de citocines en macròfags mantinguts en medi suplementat amb Se o medi control suplementat amb Se i estimulats amb LPS	89
Figura 50. Recompte d'UFC extracel·lulars i intracel·lulars en macròfags mantinguts en medi control o en medi control suplementat amb Se i estimulats amb <i>Salmonella</i> Enteritidis	90

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Contingut de Se d'alguns aliments	4
Taula 2. Denominació i funcions de les selenoproteïnes humanes.....	18
Taula 3. Principals espècies reactives d'oxigen	23
Taula 4. Activitat LDH al medi de cultiu, activitat GPX, expressió gènica relativa de GPX1, expressió gènica relativa de GPX2, expressió proteica de SELENOP i expressió gènica relativa de SELENOP en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi sense Se o en medi suplementat amb Se.....	66
Taula 5. Producció de citocines (TNF α , IL-1 β i IL-10) en macròfags mantinguts en medi sense Se o medi control i estimulats amb LPS.....	88

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

Els termes i els seus acrònims que en l'àmbit de la recerca s'utilitzen en anglès no s'han traduït al català.

Abreviatura o acrònim	Terme utilitzat en anglès	Terme utilitzat en català
ApoER2		apolipoproteïna E receptora 2
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	albúmina sèrica bovina
CCiTUB	-	Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona
CRSA	-	Centre de Recerca en Sanitat Animal
Cys	-	cisteïna
DCF		2',7'-diclorodihidrofluoresceïna
DCFH	-	2',7'-diclorodihidrofluoresceïna reduïda
DCFH-DA	-	diacetat de DCFH
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle Medium</i>	-
DNPH	-	2,4-dinitrofenilhidrazina
DNP	-	2,4-dinitrofenilhidrazona
DTNB	-	àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic)
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>	-
ELISA	-	enzimoimmunoassaig
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>	-
EF-Sec	-	factor d'elongació de la Sec
FBS	<i>fetal bovine serum</i>	sèrum fetal boví
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	-
GPX	<i>glutathione peroxidase</i>	glutatió-peroxidasa
GR	<i>glutathione reductase</i>	glutatió-reductasa
GRX	<i>glutaredoxin</i>	glutaredoxina
GSH	-	glutatió
GSSG	-	forma oxidada de GSH
H₂O-DEPC	-	aigua ultrapura tractada amb dietilpirocarbonat
HMSeBA	<i>2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid</i>	àcid 2-hidroxi-4-metilselenobutanoic
HMTBA	<i>2-hydroxy-4-methylbutanoic acid</i>	àcid 2-hidroxi-4-metilbutanoic
4-HNE	-	4-hidroxinenal
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	peroxidasa de rave

ICP-MS	<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>	espectrometria de masses per plasma d'acoblament inductiu
INT	-	clorur de 2-(4-iodofenil)-3-(4-dinitrofenil)-5-feniltetrazoli
IL	-	interleucina
IFN-γ	-	interferó γ
KMB	-	2-keto-4-metiltiobutirat
LDH	<i>lactate dehydrogenase</i>	lactat-deshidrogenasa
LPS	<i>lipopolysaccharide</i>	lipopolisacàrid
MAPK	<i>mitogen activated protein kinases</i>	proteïnes cinasa activades per mitògens
MCT1	<i>monocarboxylate transport system-1</i>	-
Met	-	metionina
MeSec	-	metil-Sec
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	multiplicitat d'infecció
NAC	<i>N-acetylcysteine</i>	N-acetilcisteïna
NF-$\kappa\beta$	<i>nuclear factor-$\kappa\beta$</i>	factor nuclear- $\kappa\beta$
NK	<i>natural killer cells</i>	cèl·lules citocides naturals
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>	patrons moleculars associats a patògens
PBS	<i>Dubelcco's Phosphate Buffered Saline</i>	solució salina amortidora de fosfats
PFA	-	paraformaldehid
PMA	-	12-miristat 13-acetat de forbol
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>	receptor específic de patrons
PSTK	-	O-fosfoseril-tRNA quinasa
RIN	<i>RNA integrity number</i>	-
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>	-
qPCR	-	PCR quantitativa a temps real
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	espècies reactives d'oxigen
Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}}	-	selenocisteil-tRNA ^{[Ser]^{Sec}}
SECIS	-	seqüència d'inserció de Sec
SELENOP	<i>selenoprotein P1</i>	selenoproteïna P1
SEPHS2	<i>selenophosphate synthetase 2</i>	selenofosfat-sintasa 2
Se-Met	-	selenometionina
Sec	-	selenocisteïna
SerS	-	seril-tRNA sintasa
SS	-	selenit de sodi
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>	factor de creixement transformant β
TMB	-	tetrametilbenzidina
TNB	-	àcid 5-tio-2-nitrobenzoic
TNFα	<i>tumour necrosis factor α</i>	factor de necrosi tumoral α
Trx	-	tioeredoxina

TSA	<i>tryptone soy agar</i>	agar de soja trípica
TXNRD	<i>thioredoxin reductase</i>	tioedoxina-reductasa
UFC	-	unitats formadores de colònies



1. INTRODUCCIÓ

1.1. Cicle del seleni a la cadena alimentària

El Se és un element que va ser descobert el 1817 per Jöns Joakob Berzelius. Fins a la meitat del segle XX va ser considerat com un element tòxic, ja que es va identificar com a principal causant de diversos episodis d'intoxicacions tant en animals com en humans (Turner i Finch, 1991; Dumont et al., 2006; Mangiapane et al., 2014). Per exemple, a finals del segle XIII, un gran nombre de cavalls i vaques d'algunes zones de la Xina i dels EUA van patir una neuropatia que s'ha atribuït l'elevada concentració de Se del farratge. Un altre exemple n'és la mort de pacients que van rebre una sobredosi de selenit sòdic com a tractament per al càncer (Turner i Finch, 1991; Mangiapane et al., 2014). Posteriorment, gràcies als estudis amb rates de Schwarz i Foltz (1957), es van descriure els efectes beneficiosos del Se de la dieta i va passar a ser considerat com a oligoelement (mineral traça) essencial per a humans i animals i més tard, com a component integral de l'enzim glutatió-peroxidasa (GPX) (Turner i Finch, 1991; Combs, 2015; Avery i Hoffman, 2018).

El cicle del Se a la cadena alimentària comença al sòl on es pot trobar en diverses formes químiques, tant inorgàniques com orgàniques. El Se inorgànic, present principalment en roques i minerals, es troba a la natura en tres estats d'oxidació: selenat (SeO_4^{2-}), selenit (SeO_3^{2-}) i selenur (Se^{2-}) (Lyons et al., 2007). Les fonts orgàniques de Se, menys abundants que les inorgàniques, són els anàlegs amb Se d'aminoàcids com la metionina (Met) i la cisteïna (Cys), la selenometionina (Se-Met) i la selenocisteïna (Sec) (Mangiapane et al., 2014). La distribució geogràfica del Se al sòl és bastant irregular. Es poden trobar tant sòls deficients com tòxics ja que el contingut de Se pot variar entre 0,1 i 2 ppm (Lyons et al., 2007). La majoria de països europeus són pobres en Se, així com també moltes zones de la costa occidental i oriental d'EUA, el Canadà, gran part d'Amèrica llatina, Austràlia i la Xina. En canvi, altres zones com Irlanda, Colòmbia i Veneçuela són considerades com a seleníferes o riques en Se. El contingut de Se al sòl determina en gran part el contingut de Se en els vegetals, i per

tant, en la dieta dels animals de granja i de l'home (McCartney, 2007; Mangiapane et al., 2014).

Les principals fonts de Se dels vegetals són les formes inorgàniques que es troben al sòl. Els vegetals no poden distingir el Se del S a causa de les seves propietats químiques semblats. A més, s'ha descrit que també són capaços d'incorporar algunes formes de Se orgàniques (Lyons et al., 2007). Les arrels poden convertir ràpidament el selenit o el selenat del sòl a Se-Met o Sec i en menor proporció a metil-Sec (MeSec) o a γ -glutamil-MeSec (Lyons et al., 2007; Marek i Stanisław, 2016). Els vegetals no acumulen grans quantitats de Se, degut a la seva elevada toxicitat, però s'han descrit vegetals acumuladors de Se que tenen la capacitat d'acumular-lo fonamentalment en forma de MeSec o γ -glutamil-MeSec (Marek i Stanisław, 2016).

Al final de la cadena, els animals obtenen el Se quan es nodreixen de vegetals i, finalment, els humans a través del consum de vegetals o de productes d'origen animal. A la Taula 1 es mostra el contingut de Se d'alguns aliments, on es posa de relleu que presenta una certa variabilitat, ja que, tal i com s'ha comentat anteriorment, la seva concentració depèn del contingut de Se en el sòl així com també de l'habilitat dels vegetals per acumular aquest element i dels animals que se'n nodreixen. Altres factors com les condicions climàtiques, els mètodes de cultiu o els utilitzats en la preparació dels aliments també hi intervenen (Lyons et al., 2007).

Taula 1. Contingut de Se d'alguns aliments (Marek i Stanisław, 2016).

Aliments	Contingut de Se ($\mu\text{g/g}$)
Productes làctics	0,01 - 0,55
Ou	0,17
Salmó	0,21 - 0,27
Carn de vedella	0,35 - 0,47
All	0,5
Ceba	0,5
Pollastre	0,57
Nous del Brasil	0,85 - 6,86

Als aliments, el Se es troba majoritàriament en forma orgànica, principalment com a Se-Met (Dumont et al., 2006; Avery, 2018). No és comú trobar Se en forma inorgànica però alguns fongs i cereals presenten altes quantitats de selenit o selenat (Thiry et al., 2012). El Se també es pot trobar formant part de les proteïnes, principalment com a Sec a les selenoproteïnes i en menor quantitat com a Se-Met en les anomenades proteïnes que contenen Se. Així doncs, aliments amb un alt contingut en proteïnes com la carn, el peix, les vísceres o els cereals presenten quantitats de Se més elevades, mentre que les fruites i els vegetals, amb un baix contingut en proteïnes, presenten un menor contingut de Se (Marek i Stanisław, 2016).

1.2. Se en la nutrició d'aviram

Els animals han de tenir una dieta equilibrada, que aporti les quantitats adequades de cadascun dels nutrients per tal de satisfer les seves necessitats pel que fa als requeriments energètics, de creixement, de reproducció i de salut. Aquests nutrients són les proteïnes, els carbohidrats, els lípids, els minerals, les vitamines i l'aigua (National Research Council, 1994). Tot i això, els pinsos utilitzats en la nutrició animal sovint contenen additius que no són considerats essencials, però que tenen una gran influència en la salut de l'animal i en el rendiment de la producció. Alguns exemples d'aquests suplementes són enzims, antioxidants, sals, aminoàcids, probiòtics, prebiòtics, pèptids antimicrobians o àcids orgànics (Ravindran i Son, 2011).

En relació als minerals, es classifiquen en dues categories segons la quantitat requerida a la dieta (Edens i Gowdy, 2004):

- **Macrominerals:** la seva concentració en el pinso s'expressa com a percentatge sobre el total de nutrients de la dieta. Inclouen elements com Ca, P, Na i K. Són essencials per a la correcta integritat estructural de l'organisme i en la regulació osmòtica i del pH.
- **Microminerals, elements traça o oligoelements:** la seva presència al pinso s'expressa en mg/kg de pinso o en ppm. Inclouen elements com Mn, Z, Fe, Cu, I i Se.

A l'organisme formen part de substàncies com hormones, enzims o cofactors específics.

En els últims 40 anys, la indústria avícola ha progressat molt ràpidament. Tant la producció d'ous de gallina com la producció de carn de pollastre ha incrementat fins a tres vegades. Aquest avenç en la indústria avícola ha estat possible gràcies al progrés de la recerca genètica, així com també a millores en la dieta dels animals. De totes maneres, l'increment dels paràmetres de producció ocasionats per l'alta demanda de la població mundial i el curt cicle de creixement al que estan sotmesos els animals (35-42 dies) produeixen un augment de l'estrès. Així doncs, la presència a la dieta de nutrients amb capacitat per reduir l'estrès oxidatiu és de gran importància en la indústria avícola moderna. D'entre els diversos compostos amb activitat antioxidant, el Se n'és un element important (Surai, 2006). A més, cal considerar que l'enriquiment amb Se de productes d'origen animal (principalment carn, llet i ous) a través del pinso és una via efectiva d'incrementar l'aport de Se en humans (Fisinin et al., 2009).

1.2.1. Suplements nutricionals de Se en aviram

En condicions fisiològiques, l'*European Food Safety Authority* (EFSA) aconsella no superar la suplementació del pinso de l'aviram amb més de 0,2 mg Se/kg de pinso (EFSA FEEDAP Panel 2013, 2014, 2016). De totes maneres, hi ha diversos factors que poden fer variar aquestes quantitats com són l'edat, l'espècie, si es tracta de gallines ponedores o d'engreix (destinades a la producció de carn) i sobretot, si les condicions d'estabulació en les que es troben impliquen un major estrès.

Existeix, però, una gran controvèrsia pel que fa al Se com a suplement, ja que és considerat un element essencial però amb un marge de seguretat i eficàcia molt estret que pot variar segons la forma química (Dumont et al., 2006). De fet, les recomanacions en la suplementació del pinso dels animals de granja estan dissenyades per cobrir els requeriments sense comprometre la seguretat del consumidor (Brandt-Kjelsen et al., 2017). En termes de producció animal, una

deficiència de Se es relaciona amb un menor rendiment ja que pot causar una disminució de la producció i qualitat dels ous i de la carn, una reducció de la fertilitat i una disminució de la viabilitat dels pollets (Surai, 2006). En canvi, a dosis elevades, el Se produeix toxicitat en animals i pot donar lloc a problemàtiques en l'àmbit de la contaminació ambiental (Lyons et al., 2007).

1.2.2. Fonts de Se utilitzades en nutrició animal

L'any 1974, la *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) va aprovar l'ús de selenit i selenat com a formes de suplementació de Se en les dietes de pollastres i porcs, essent per tant les formes més comercialitzades. La utilització de fonts inorgàniques de Se entra en contradicció amb l'evidència que indica que el sistema digestiu està més ben adaptat a l'absorció de formes orgàniques de Se. Cal recordar que en la majoria d'ingredients presents en una dieta per aviram (cereals, soja, etc.) hi ha majoritàriament Se en forma orgànica, principalment Se-Met. En els últims anys, s'ha publicat un nombre important d'estudis que indiquen que la forma química de Se és determinant per assolir-ne una concentració òptima a l'organisme i remarquen els desavantatges de l'ús de les fonts de Se inorgàniques (Surai, 2006). A més, s'ha demostrat que la substitució de selenit per fonts orgàniques de Se en dietes per aviram millora la fertilitat i la viabilitat dels pollastres pel que fa al seu desenvolupament primerenc, a més de transferir-se millor a l'embrió, fet que ajuda al pollastre a superar l'estrès oxidatiu que suposa l'eclosió (Surai, 2006). L'any 2000, l'FDA va aprovar l'ús de la Se-Met com a suplement per a dietes per aviram. Actualment ja existeix una regulació europea que permet la utilització d'una ampla varietat de fonts orgàniques de Se que es poden utilitzar com a suplementes en dietes per animals (EFSA FEEDAP Panel 2013 i 2014; EFSA FEEDAP Panel et al., 2018). Les diferents fonts orgàniques de Se autoritzades a Europa són: selenit de sodi (SS), L-Se-Met, DL-Se-Met, l'hidroxiàleg de la Se-Met (àcid 2-hidroxi-4-metilselenobutanoic, HMSeBA), Zn-L-Se-Met i llevats enriquits amb Se-Met, entre d'altres (EFSA FEEDAP Panel 2013 i 2014; EFSA FEEDAP Panel et al., 2018).

A continuació es descriuen les principals característiques de les fonts de Se utilitzades en aquest estudi.

1.2.2.1. Selenit de sodi (SS)

Tal i com ja s'ha comentat anteriorment, aquesta font de Se (Figura 1) va ser la primera emprada com a suplement en dietes per a aus de corral (Burk i Hill, 2015). És una font molt econòmica que ha permès reduir la incidència de malalties associades a la deficiència de Se. Tot i això, la utilització d'aquesta forma química ha generat força controvèrsia degut als inconvenients associats al seu ús, com la toxicitat, les interaccions amb altres minerals i vitamines i la seva incapacitat per crear i mantenir reserves de Se a l'organisme a causa de la seva mala retenció i baixa eficiència per a transferir-se als teixits (Khan et al., 2016). Per exemple, un dels problemes associats a l'SS és la seva baixa biodisponibilitat a causa de la seva reducció a Se elemental quan està en contacte amb alguns components de la dieta com pot ser l'àcid ascòrbic (Surai, 2006).

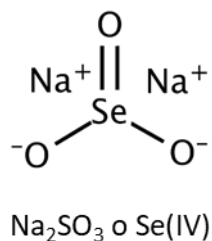


Figura 1. Fórmula i estructura química del selenit de sodi (SS).

1.2.2.2. Selenometionina (Se-Met)

La Se-Met (Figura 2) és la principal font orgànica de Se utilitzada en nutrició animal, constituint entre un 50-80 % del Se total ingerit (Surai, 2002). La Se-Met compleix amb els criteris necessaris per considerar-lo un aminoàcid essencial, atès que es tracta

d'un aminoàcid que l'organisme no pot sintetitzar (Schrauzer, 2000 i 2003; Edens i Gowdy, 2004; Burk i Hill, 2015).

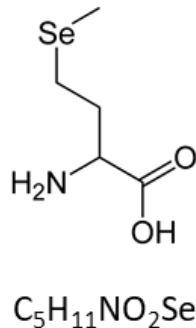


Figura 2. Fórmula i estructura química de la selenometionina (Se-Met).

1.2.2.3. Hidroxianèleg de la Se-Met (HMSeBA)

Actualment, és present al mercat l'hidroxianèleg de la Se-Met, l'HMSeBA, amb el nom comercial *Selisseo*® (Briens et al., 2013 i 2014). Existeixen diversos estudis que consideren que és una bona alternativa com a font orgànica de Se (Briens et al., 2013; Brandt-Kjelsen et al., 2017). La diferència respecte a la Se-Met és la substitució del grup amino del carboni α per un grup hidroxil (Figura 3). Aquesta modificació ja existeix per l'aminoàcid Met, donant lloc a l'hidroxianèleg 2-hidroxi-4-metiltiobutanoic (HMTBA), substrat àmpliament utilitzat en la nutrició d'animals de granja com a font de Met (Martin-Venegas et al., 2006).

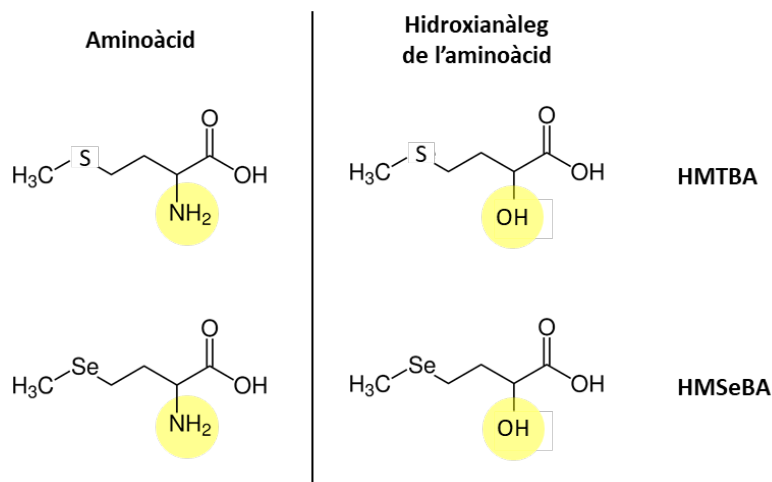


Figura 3. Estructura química de la metionina (Met) i de la selenometionina (Se-Met) i dels seus respectius hidroxianàlegs.

1.3. Absorció i metabolisme de les diferents fonts de Se

1.3.1. Absorció

Existeix una gran controvèrsia en quant als mecanismes implicats en els processos d'absorció de les diferents fonts de Se. Els estudis realitzats mostren informació contradictòria ja que s'utilitzen línies cel·lulars i/o condicions experimentals diferents que poden afectar dràsticament els mecanismes implicats. De totes maneres, atès que el Se i el S tenen propietats similars, la gran majoria de compostos amb Se són absorbits per les mateixes vies que els seus anàlegs sofrats (Thiry et al., 2012).

A continuació es descriuen els processos d'absorció de les diferents fonts de Se utilitzades en aquest estudi (Figura 4).

- **SS:** està descrit que l'SS travessa l'epiteli principalment per difusió simple. Tot i això, també s'ha descrit que pot reaccionar a la llum intestinal de manera no enzimàtica amb el glutatió (GSH) per formar selenodiglutió i travessar així

l'epiteli, fet que augmenta la seva biodisponibilitat (Schrauzer i Surai, 2009; Roman et al., 2014).

- **Se-Met:** s'ha descrit que la Se-Met travessa l'epiteli utilitzant els mateixos sistemes de transport que la Met (Roman et al., 2014). En aquest sentit, diferents estudis descriuen que ambdós substrats comparteixen sistemes de transport dependents de Na⁺ (Nickel et al., 2009; Thiry et al., 2012; Juniper et al., 2019). Tanmateix, encara no s'ha establert l'afinitat d'aquests sistemes de transport per la Se-Met. Diversos estudis confirmen que les formes orgàniques s'absorbeixen més eficientment i presenten una major biodisponibilitat que les inorgàniques (Leblondel et al., 2001; Thiry et al., 2012). Lyons et al. (2007) van observar que la Se-Met s'absorbeix fins a quatre vegades més ràpid que l'SS.
- **HMSeBA:** s'ha demostrat que l'HMSeBA pot travessar la membrana per un mecanisme de transport dependent de H⁺ i que s'inhibeix per lactat (Campo-Sabariz et al., 2019). De fet, el seu anàleg sofrat, l'HMTBA, utilitza el sistema de transport MCT1 (Monocarboxylate Transport System-1), un transportador per àcids monocarboxílics com el lactat i dependent de H⁺ (Martin-Venegas et al., 2006).

1.3.2. Metabolisme

L'objectiu del metabolisme del Se és la transformació de les diferents fonts en selenur (Figura 4), punt pivotal en el metabolisme del Se en el que o bé és desviat cap a la síntesi de selenoproteïnes o bé és excretat en forma de petits metabòlits, ja que el Se com a tal, no es pot emmagatzemar a l'organisme (Thiry et al., 2012). Cal tenir en compte, doncs, que les diferents formes de Se dels aliments no poden ser utilitzades directament per la síntesi de selenoproteïnes ja que cal que siguin transformades prèviament a selenur (Thiry et al., 2012). Tot i que el fetge té un paper crucial, existeixen altres òrgans metabòlicament molt actius i que, per tant, també participen en la regulació del contingut de Se. Un exemple n'és l'epiteli intestinal, ja que part de la seva energia metabòlica l'extreu del catabolisme d'aminoàcids provinents de la

dieta, just abans que entrin a circulació sistèmica. És per aquest motiu doncs, que l'intestí no només té un paper important en la digestió i absorció d'aminoàcids i els seus hidroxianàlegs sinó que també en pot determinar la seva biodisponibilitat (Martin-Venegas et al., 2006).

A continuació es descriuen els processos metabòlics de les diferents fonts de Se utilitzades en aquest estudi (Figura 4).

- **SS:** un cop absorbits, tant l'SS com el selenodiglutatió són reduïts a selenur per l'acció de l'enzim glutatió-reductasa (GR) o pel sistema tioredoxina, respectivament (Roman et al., 2014).
- **HMSeBA:** en tractar-se d'un precursor de la Se-Met és necessari que sigui prèviament transformat a Se-Met tot seguint la mateixa ruta metabòlica que el seu anàleg sofrat, l'HMTBA (Briens et al., 2013). En aquesta ruta metabòlica, l'HMTBA és primerament oxidat a 2-keto-4-metiltiobutirat (KMB) per un procés enzimàtic estereoespecífic per acció dels enzims L-2-hidroxiàcid oxidasa i D-2-hidroxiàcid deshidrogenasa. En segon lloc, el KMB és transaminat per formar Met gràcies a la intervenció de diferents transaminases (Martin-Venegas et al., 2011). En estudis realitzats amb pollastres es va demostrar que l'HMSeBA és convertit a Se-Met i Sec en diversos teixits (Briens et al., 2013 i 2014).
- **Se-Met:** la Se-Met pot incorporar-se de manera inespecífica a proteïnes de l'organisme (Thiry et al., 2012; Burk i Hill, 2015). Aquesta incorporació de la Se-Met en posicions on aniria Met no és molt freqüent i es produeix de manera aleatòria degut a que els enzims involucrats en la síntesi i incorporació de Met no són capaços de discriminar entre aquests dos anàlegs (Salinas, 2010). Una altre via metabòlica és la trans-selenació (anomenada també transsulfuració per la importància d'aquesta via en el metabolisme de la Met) en la que la Se-Met dona lloc a la Sec. La Sec és l'anàleg de l'aminoàcid Cys i és considerat com el 21è aminoàcid (Mousa et al., 2017). La concentració de Sec a l'organisme és baixa, ja que és molt reactiva i és ràpidament transformada a selenur i alanina per l'enzim β -liasa (Burk i Hill, 2015).

La Se-Met també pot formar selenur per una via metabòlica diferent en la que l'enzim γ -liasa la converteix en metilselenol, que un cop desmetilat, produeix selenur. De totes maneres, no és una via metabòlica molt activa i sembla més aviat un procés per alliberar Se de la Se-Met present en proteïnes quant la quantitat de Se a l'organisme és baixa (Thiry et al., 2012; Burk i Hill, 2015).

1.3.3. Excreció del Se

El Se consumit per sobre dels requeriments per la producció de selenoproteïnes és excretat per diverses vies. Tant la Se-Met com el selenur poden patir diverses metilacions que originen metabòlits (metilselenol, dimetilselenur o ió trimetilselemoni) que poden ser excretats principalment per orina o a través de la respiració (Figura 4). El selenur també pot conjugarse amb l'*N*-acetil galactosamina formant principalment el seleno-sucres 1 β -metilseleno-*N*-acetil-D-galactosamina, excretat també per orina (Burk i Hill, 2015). Així doncs, la formació de compostos d'excreció forma part de sistemes de detoxificació que competeixen pel selenur format en excés en el moment de sintetitzar selenoproteïnes (Burk i Hill, 2015). Cal tenir en compte que l'acumulació en els teixits de les formes orgàniques és major que per les inorgàniques de manera que la semivida de la Se-Met és de 252 dies, mentre que la del selenit és de només 102 dies (Lyons et al., 2007).

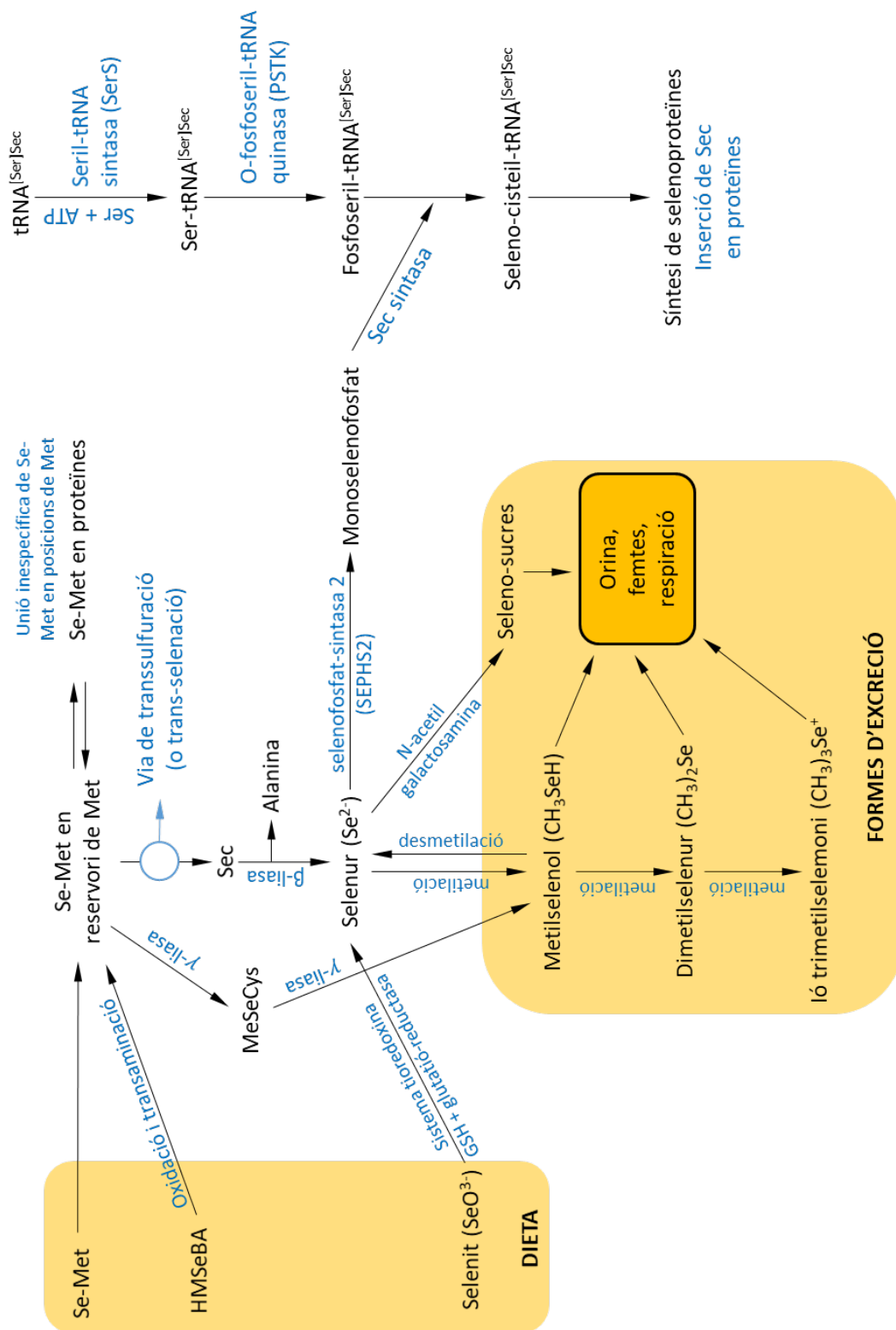


Figura 4. Esquema del metabolisme del Se (Kryukov et al., 2003; Lyons et al., 2007; Salinas, 2010; Thiry et al., 2012; Roman et al., 2014; Burk i Hill, 2015).

1.4. Selenoproteïnes

1.4.1. Síntesi de selenoproteïnes

El primer pas en la síntesi de selenoproteïnes és la formació de monoselenofosfat a partir de selenur per l'enzim selenofosfat-sintasa 2 (SEPHS2) (Figura 4). El selenur que prové del metabolisme de la Sec és el substrat preferit de l'enzim SEPHS2, ja que l'enzim β -liasa li transfereix el selenur directament, fet que protegeix la Sec per tal que no reaccionï amb cap altre compost (Burk i Hill, 2015). L'enzim SEPHS2, és una peça pivot en la regulació de la quantitat de Se a l'organisme, doncs d'ell depèn que la síntesi de selenoproteïnes sigui òptima (Burk i Hill, 2015).

Per la síntesi de selenoproteïnes també és clau l'RNA de transferència tRNA^{[Ser]Sec}. La seva seqüència, així com la seva estructura secundària i terciària, el fa un RNA de transferència únic en comparació amb d'altres tRNA. Existeixen dos isoformes de tRNA^{[Ser]Sec} que es distingeixen per la metilació del nucleòtid de la posició 34. Tot i que existeixen d'altres modificacions de bases, aquesta resulta especialment important ja que s'ha determinat que el Se pot desviar l'expressió cap a una isoforma o cap a una altra, alterant així el procés de traducció durant l'expressió de les selenoproteïnes. La isoforma desmetilada és dominant en situacions de deficiència de Se, mentre que la isoforma metilada ho és quan les concentracions de Se es normalitzen (Burk i Hill, 2015).

Per la formació de selenoproteïnes, primer cal que aquest tRNA^{[Ser]Sec} sigui aminoacilat amb una serina, gràcies a l'enzim seril-tRNA sintasa (SerS), donant lloc al seril-tRNA^{[Ser]Sec}. Seguidament, el seril-tRNA^{[Ser]Sec} es fosforila i dona lloc a fosfoseril-tRNA^{[Ser]Sec} gràcies a l'enzim O-fosfoseril-tRNA quinasa (PSTK) (Burk i Hill, 2015). El monoselenofosfat és el donador de Se utilitzat per la conversió de fosfoseril-tRNA^{[Ser]Sec} en selenocisteil-tRNA^{[Ser]Sec} (Sec-tRNA^{[Ser]Sec}) per acció de la Sec sintasa. El

Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} permet que la Sec sigui inserida a les selenoproteïnes durant el procés de traducció (Burk i Hill, 2015).

L'mRNA que codifica les selenoproteïnes també presenta una estructura única que el diferencia d'altres mRNA, ja que presenta una estructura secundària en forma de nansa anomenada seqüència d'inserció de Sec (SECIS), que conté un codó UGA. El codó UGA té doncs una doble funcionalitat ja que en absència de l'element SECIS senyalitza la finalització de la síntesi de la proteïna, mentre que en la seva presència permet que un residu de Sec sigui inserit en el seu lloc (Kryukov et al., 2003). En aquest procés també cal que el Sec-tRNA^{[Ser]^{Sec}} sigui reconegut pel factor d'elongació de Sec (EF-Sec) (Salinas, 2010) (Figura 5). Aquest element SECIS varia en la seva estructura entre els mRNA de diferents selenoproteïnes (Kryukov et al., 2003; Burk i Hill, 2015) (Figura 6).

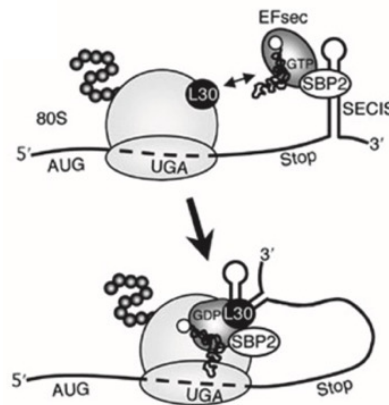


Figura 5. Incorporació de la selenocisteïna (Sec) a la síntesi de selenoproteïnes (Salinas, 2010).

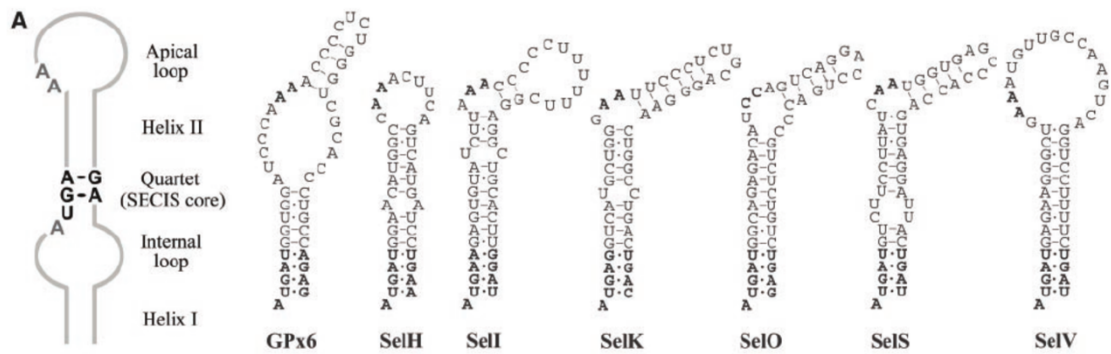


Figura 6. Estructura de la seqüència d'inserció de Sec (SECIS) de diverses selenoproteïnes (Kryukov, 2003).

1.4.2. Distribució i funció de les selenoproteïnes

Les selenoproteïnes tenen la capacitat de dur a terme diferents funcions fisiològiques necessàries per al manteniment de l'homeòstasi de l'organisme (Edens i Gowdy, 2004) (Taula 2). Actualment, al genoma humà, s'han descrit 25 gens que codifiquen per selenoproteïnes i s'han caracteritzat fins a 50 famílies diferents, la majoria identificades per aproximacions bioinformàtiques. Un tret comú de totes les selenoproteïnes és la presència de com a mínim un aminoàcid Sec al centre actiu de la selenoproteïna (Burk i Hill, 2015).

Algunes de les funcions més rellevants del Se estan relacionades amb la formació de selenoproteïnes involucrades en el manteniment del balanç oxidació-reducció de l'organisme davant de situacions d'estrès oxidatiu (Edens i Gowdy, 2004; Surai, 2006), fet que les relaciona amb el desenvolupament de sistemes d'alta renovació cel·lular com són el sistema immunitari i el sistema digestiu, així com amb l'envelliment i el càncer (Surai, 2002).

Taula 2. Denominació i funcions de les selenoproteïnes humanes (informació adaptada de Mangiapane et al., 2014).

Nom de la selenoproteïna	Funció
GPX	Conté diverses isoformes relacionades amb l'activitat antioxidant
Deiodinasa	Conté diverses isoformes relacionades amb la regulació de la producció d'hormones tiroïdals
TXNRD	Conté diverses isoformes relacionades amb l'activitat antioxidant
Selenoproteïna H	Activitat antioxidant
Selenoproteïna I	Biosíntesi de fosfolípids
Selenoproteïna K	-
Selenoproteïna M	Activitat antioxidant
Selenoproteïna N	Senyalització de calci i desenvolupament primari del múscul
Selenoproteïna O	Possible activitat antioxidant
Selenoproteïna P (SELENOP)	Transport de Se i activitat antioxidant
Selenoproteïna R	Activitat antioxidant
Selenoproteïna S	Eliminació de proteïnes amb defectes estructurals
Selenoproteïna T	Mobilització de calci
Selenoproteïna V	Maduració dels testicles
Selenoproteïna W	Activitat antioxidant
SEPHS2	Síntesi de selenoproteïnes

A continuació es descriuen més detalladament les selenoproteïnes considerades en aquest estudi.

1.4.2.1. Glutatió-peroxidasa (GPX)

En mamífers existeixen fins a 8 isoformes de GPX (GPX1-8), cinc de les quals són selenoproteïnes perquè contenen una Sec al seu centre actiu (GPX1-4 i GPX6), mentre que les altres 3 presenten una Cys. La majoria de les isoformes són dependents de GSH i catalitzen la reducció del peròxid d'hidrogen i d'altres hidroperòxids a aigua (Figura

7), però algunes utilitzen grups tiol [tioredoxines (Trx) o tiol oxidoreductases] per a dur a terme la seva activitat (Salinas, 2010).

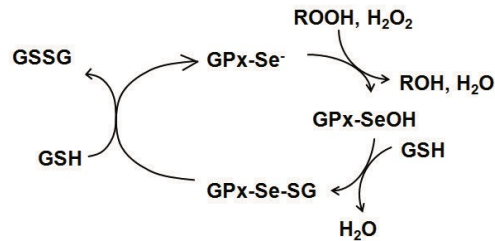


Figura 7. Esquema del mecanisme catalític de l'enzim glutatió-peroxidasa (GPX) (Salinas, 2010).

A l'intestí s'ha descrit la presència de quatre isoformes de GPX (Surai, 2006; Circu i Aw, 2011):

- GPX1 és la isoforma més expressada al llarg de tot l'eix cripta-vellositat, sobretot en enteròcits. És dependent de GSH.
- GPX2 s'expressa a les cèl·lules de l'epiteli intestinal, principalment de les criptes. És dependent de GSH.
- GPX3 és principalment secretada pel fetge al plasma. A l'intestí és secretada també per enteròcits cap a la llum intestinal, participant en la defensa de la mucosa intestinal enfront de l'estrès oxidatiu. És dependent de GSH, però també pot utilitzar Trx. Té la capacitat de reduir hidroperòxids, inclús hidroperòxids fosfolipídics.
- GPX4 és la isoforma que presenta una distribució més diversa, ja que s'ha trobat tant en el citoplasma, com en els mitocondris o unida a la membrana cel·lular. A l'intestí es localitza al llarg de tot l'intestí prim i gros. És dependent de GSH. Té la capacitat de reduir tant hidroperòxids com hidroperòxids fosfolipídics.

1.4.2.2. Tioredoxina-reductasa (TXNRD)

Són una família d'enzims que pertanyen a la superfamília de les oxidoreductases (piridin-nucleòtid tio-disulfur oxidoreductases) i que juntament amb l'enzim Trx conformen el major sistema de reducció de ponts disulfur de l'organisme (Labunskyy et al., 2014). La TXNRD obté els electrons de NADPH que, a través de les dues subunitats que presenta, són transferits al centre actiu de la Trx, que té la capacitat de trencar els ponts disulfur de proteïnes, formats degut a l'estrès oxidatiu (Holmgren i Lu, 2010) (Figura 8).

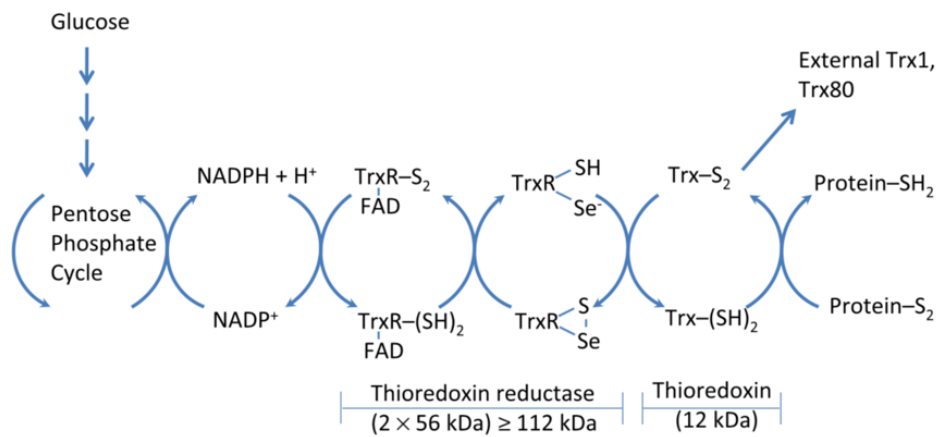


Figura 8. Esquema del flux d'electrons del sistema tioredoxina-reductasa (TXNRD; TrxR a la imatge)-tioredoxina (Trx) (Holmgren i Lu, 2010).

Dins d'aquesta família existeixen tres isoformes (TXNRD1-3), totes amb estructura d'homodímer i amb un residu Sec en la seva cadena, concretament a la penúltima posició en el terminal -COOH on es troba el centre actiu de l'enzim. TXNRD1 utilitza la Trx present al citosol cel·lular (Trx1) com a principal substrat. La reducció de ponts disulfur així com també la seva capacitat per reduir hidroperòxids l'involucren en la regulació de l'estrès oxidatiu i de factors de transcripció així com també en processos de reparació de DNA i de senyalització cel·lular (Labunskyy et al., 2014). TXNRD2, també anomenada tioredoxina/glutatió-reductasa, es troba molt present als testicles durant la maduració de l'esperma en la pubertat. Aquesta proteïna conté un domini

glutaredoxina (GRX) addicional al terminal -NH₂, gràcies al qual té també activitat GRX, de manera que redueix ponts disulfur gràcies a la reducció tant de GSH com de Trx. TXNRD3 es localitza als mitocondris i s'encarrega de la reducció de la Trx2 o GRX2 mitocondrial (Labunsky et al., 2014).

1.4.2.3. Selenoproteïna P1 (SELENOP)

La SELENOP s'expressa de manera abundant en pràcticament tots els teixits, tot i que es sintetitza de forma predominant al fetge. La seva estructura es caracteritza per tenir un gran nombre de residus Sec així com presentar dos elements SECIS al seu mRNA. La seva funció principal és transportar el Se que ha arribat al fetge a través de la sang i distribuir-lo cap a altres teixits i òrgans, sobretot a l'encèfal i als testicles (Labunsky et al., 2014). Existeixen diversos receptors per SELENOP en els teixits que permeten la recaptació de Se com per exemple l'apolipoproteïna E receptora 2 (ApoER2), que recapta Se de SELENOP als testicles i a l'encèfal, o la megalina, que recapta el Se als ronyons. La recaptació de Se des de la SELENOP també es pot produir per altres mecanismes, com la pinocitosi cel·lular, tot i que sembla ser un mecanisme utilitzat només en casos de deficiència de Se (Labunsky et al., 2014). A més, es postula que poden haver-hi altres molècules capaces de transportar Se que encara no han estat identificades (Burk i Hill, 2015).

A més, la presència de residus Sec en ambdós terminals de la proteïna podrien conferir certa activitat oxidoreductasa a aquesta selenoproteïnes, atorgant-li no només un paper en el transport de Se, sinó també capacitat antioxidant (Labunsky et al., 2014). En aquest sentit, s'ha descrit que SELENOP té capacitat per oxidar GSH en presència d'un hidroperòxid (Burk i Hill, 2015).

1.4.3. Jerarquia de les selenoproteïnes

Una vegada va ser possible començar a quantificar les diferents selenoproteïnes, es va observar que la restricció de Se en la dieta d'alguns animals reduïa l'expressió d'algunes selenoproteïnes en alguns teixits, mentre que en d'altres, es mantenia invariable la seva expressió. A partir d'aquesta observació es va desenvolupar el concepte de jerarquia de les selenoproteïnes. Quan el contingut de Se a l'organisme és insuficient per mantenir l'expressió de totes les selenoproteïnes, la síntesi d'algunes d'elles és reduïda per tal de mantenir la d'altres. Aquest procés és encara més complex del que sembla ja que s'ha determinat que la jerarquia de les selenoproteïnes és un fenomen cel·lular, essent diferent segons el tipus cel·lular. A més, també pot estar condicionada per les diferents condicions fisiològiques (Burk i Hill, 2015).

La jerarquia de les selenoproteïnes té lloc en dos nivells que actuen en tàndem: a nivell cel·lular (a partir de la regulació de la síntesi de selenoproteïnes) i a nivell de tot l'organisme (on el Se és transportat des del fetge prioritàriament a determinats òrgans). Per exemple, davant d'una deficiència de Se es produeix el catabolisme de la GPX1 hepàtica per produir SELENOP i suplir a l'encèfal amb Se per a que aquest pugui sintetitzar GPX4, la principal selenoproteïna expressada en aquest òrgan (Labunskyy et al., 2014; Burk i Hill, 2015).

Alguns dels mecanismes implicats en la jerarquia de l'expressió de selenoproteïnes són: la presència de dues isoformes diferents de tRNA, la presència de proteïnes reguladores que s'uneixen a l'element SECIS i al ribosoma i alteren l'eficiència de la traducció o la inhibició de la lectura per part del ribosoma del codó UGA en el moment d'inserir la Sec (Burk i Hill, 2015).

1.5. Se i salut

1.5.1. Sistemes de defensa contra l'estrès oxidatiu

L'organisme està sotmès a un constant atac d'espècies reactives d'oxigen (ROS), tant d'origen extern com intern, en aquest últim cas produïts per la pròpia activitat metabòlica o com a part de l'estratègia del sistema immunitari per destruir microorganismes nocius. Existeixen diversos tipus de ROS: radicals i no radicals (Taula 3).

Taula 3. Principals espècies reactives d'oxigen (ROS) (Surai, 2006).

Espècies reactives d'oxigen (ROS)	
Radicals	No radicals
Superòxid ($O_2^{\cdot-}$)	Peròxid d'hidrogen (H_2O_2)
Hidroxil (OH^{\cdot})	Peròxids orgànics (ROOH)
Hidroperoxil (HO_2^{\cdot})	Peroxinitrit ($ONOO^-$)
Peroxil (RO_2^{\cdot})	Àcid hipoclorós (HOCl)
Alcoxil (RO^{\cdot})	Àcid hipobromós (HOBr)

A l'organisme existeixen tres nivells de defensa enfront de les ROS: el primer, per evitar-ne la seva formació, dut a terme per les selenoproteïnes entre d'altres enzims antioxidants; el segon, per evitar-ne la propagació en cadena, dut a terme per compostos com vitamines (A, E i C), carotenoides, GSH, etc.; i el tercer, per reparar les molècules danyades (lípid, proteïnes, DNA, etc.), dut a terme per enzims com lipases, transferases i enzims de reparació de DNA, entre d'altres (Surai, 2006).

1.5.2. Se i salut intestinal

La principal funció del tracte gastrointestinal és la digestió dels aliments i l'absorció dels nutrients que en resulten, des de la llum intestinal cap a la circulació sistèmica.

Així doncs, l'intestí és una estructura molt especialitzada, amb característiques morfològiques i funcionals dirigides a facilitar la seva funció d'absorció i de protecció davant tot un seguit d'agents externs potencialment nocius. Així, l'intestí permet el pas de nutrients i altres molècules però en restringeix l'entrada de patògens, toxines, antígens i d'altres. Aquesta propietat es coneix com a funció intestinal de barrera.

L'epiteli intestinal, la capa de la mucosa en contacte amb la llum intestinal (Figura 9), està format per una monocapa de cèl·lules epitelials distribuïdes en l'eix cripta-vellositat i especialitzades en el transport de substàncies i en la funció epitelial de barrera, essent els enteròcits les cèl·lules majoritàries. Els enteròcits són cèl·lules columnars o cilíndriques altament polaritzades, responsables del transport vectorial dels nutrients a través de la membrana apical fins a la membrana basolateral, per arribar així al torrent sanguini. Els enteròcits estan connectats per unions intercel·lulars que aïllen el compartiment subepitelial, conferint així permeabilitat selectiva a l'epiteli intestinal. La presència d'aquestes unions permet el pas de molècules a través de l'epiteli intestinal per dues vies: la paracel·lular, a través dels espais intercel·lulars de l'epiteli intestinal i la transcel·lular, a través de la membrana apical i basolateral dels enteròcits.

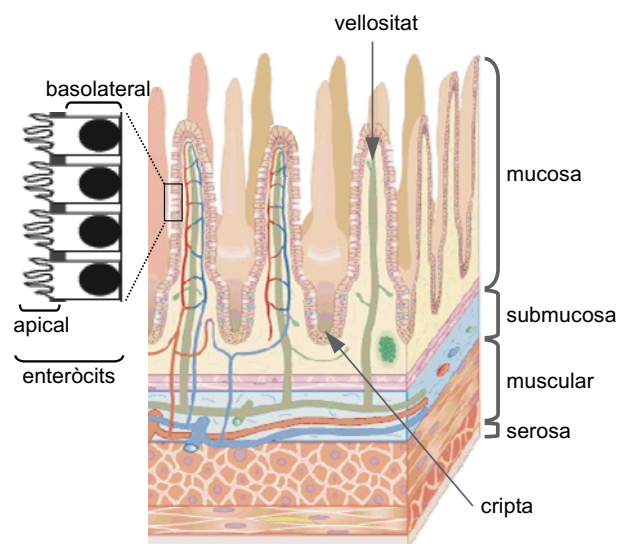


Figura 9. Estructura de la paret intestinal. Adaptació de la imatge extreta del web <http://faculty.southwest.tn.edu/jiwilliams/intestine.gif>.

Tot i que la dieta aporta nutrients que tenen una capacitat antioxidant pròpia (vitamina A i E, carotenoides i flavonoides, entre d'altres), els aliments poden anar acompanyats també de substàncies potencialment nocives (micotoxines, metalls pesats, àcids grassos poliinsaturats, etc.), moltes d'elles amb una alta capacitat prooxidant. És per aquest motiu doncs, que el balanç entre substàncies antioxidants i prooxidants a l'intestí és un fet determinant en la salut intestinal. S'ha descrit que la presència de grans quantitats de ROS al sistema digestiu s'associa a pancreatitis, colitis, isquèmia intestinal o úlcera gàstrica. La presència, doncs, de compostos amb activitat antioxidant o elements com el Se que promouen la síntesi de selenoproteïnes poden contribuir, per tant, al potencial antioxidant total del tracte gastrointestinal (Surai, 2006).

1.5.3. Se i sistema immunitari intestinal

El sistema immunitari és el responsable de tot un seguit de mecanismes de defensa contra diversos agents externs com microorganismes, toxines, paràsits, antígens, etc. És tracta d'un sistema complex que actua de manera coordinada, amb dos tipus de respostes:

- **la immunitat innata** és la primera línia de defensa que engloba barreres físiques (pell, mucoses, etc.), molècules encarregades de la degradació dels patògens i cèl·lules amb activitat fagocítica, com els macròfags o els neutròfils entre d'altres. La resposta de la immunitat innata es caracteritza per ser immediata, inespecífica i sense memòria.
- **la immunitat adquirida** és la resposta que està mediada pels limfòcits B i T. És una resposta immunitària més específica i tardana que reconeix l'agent invasor que ha produït l'atac i en genera una memòria immunològica. La resposta pot ser de tipus cel·lular, en la que els limfòcits T s'encarreguen de la detecció de les cèl·lules infectades i les destrueixen, o una resposta humoral, en la que els limfòcits B secreten anticossos (immunoglobulines) capaces de reconèixer els antígens.

En condicions fisiològiques, el sistema immunitari de l'intestí actua prevenint o modulant la resposta a antigens coneguts o innocus. Aquest estat, també anomenat estat de tolerància, és mediat a través de la secreció de citocines antiinflamatòries com el factor de creixement transformant β (TGF- β) i la interleucina-10 (IL-10), que poden controlar la inducció de la inflamació (Maynard et al., 2012; Kogut i Arsenault, 2017). Tant les cèl·lules de l'epiteli intestinal com les cèl·lules immunitàries són capaces de reconèixer patrons moleculars associats a patògens (PAMP) a través de receptors específics de patrons (PRR) presents a la membrana, fet que inicia la resposta inflamatòria. En primera instància, els mecanismes activats són els de la resposta immunitària innata que inclou la producció de citocines proinflamatòries [IL-6, IL-8, interferó- γ (IFN- γ), factor de necrosi tumoral α (TNF α), IL-1 β], que promouen l'arribada d'altres cèl·lules del sistema immunitari com cèl·lules citocides naturals (NK), macròfags i limfòcits. Aquesta resposta immunitària pot ser efectiva contra els patògens, però si es prolonga excessivament en el temps pot acabar produint efectes no desitjats. L'intestí és extremadament sensible al dany ocasionat per la resposta del seu propi sistema immunitari (Strober et al., 2002). Freqüentment, els patògens, altres estressants externs o la pèrdua de l'estat de tolerància de l'intestí, poden induir l'activació de respostes immunitàries inefectives que no són capaces de controlar la infecció i que poden causar una inflamació persistent que provoca en d'altres problemes com dany tissular, febre, malabsorció de nutrients etc., que deriven finalment en el trencament de la funció epitelial de barrera (Surai, 2006; de Kivit et al., 2014; Berghman, 2016; Broom, 2018).

El Se, com a element que forma part de proteïnes amb activitat antioxidant, també té un paper important en la regulació del sistema immunitari. A més de permetre la síntesi de selenoproteïnes que regulen el balanç de substàncies pro i oxidants a l'intestí, s'ha observat que també és capaç d'incrementar la producció d'anticossos i modular l'activitat d'algunes cèl·lules del sistema immunitari, com els macròfags i les cèl·lules T. També s'ha determinat que el Se mostra propietats antivirals i antibacterianes, que és capaç d'alleugerar el curs de certes malalties com l'hepatitis i

que, gràcies a la seva capacitat antioxidant, participa en certs mecanismes antitumorals (Surai, 2006).

1.5.3.1. Macròfags

Entre les diverses cèl·lules del sistema immunitari, els macròfags tenen diverses funcions essencials en l'activació de la resposta immunitària. Els macròfags tenen la capacitat de fagocitar les partícules o patògens foranis, destruint-los i presentant a la seva membrana part d'aquests en forma d'antígens processats que permeten el reconeixement per part dels limfòcits T, que inicien la resposta immunitària adquirida. Per altra banda, també tenen la capacitat de sintetitzar i secretar prostaglandines i citocines amb activitat pro o antiinflamatòria. L'activació dels macròfags també va acompanyada d'un increment en la producció de ROS com anions superòxid, radicals hidroxil, hidroperòxids, etc., que creen un entorn desfavorable per al patògen, afavorint la seva destrucció (Surai, 2006). Finalment, els macròfags també tenen una funció de manteniment i neteja de cèl·lules apoptòtiques i de reciclatge de nutrients mitjançant la digestió de productes de rebuig de l'organisme (Setta et al., 2012; Arango Duque i Descoteaux, 2014).

Així doncs, els macròfags presenten diverses funcions que tenen la finalitat de controlar o incrementar la resposta inflamatòria segons el microambient en el que es troben. És per aquest motiu que els macròfags presenten una plasticitat funcional que els permet polaritzar-se cap a macròfags clàssics, també anomenats M1, o cap a macròfags alternatius, també anomenats M2. Els senyals que reben i que medien aquesta polarització són diversos i cal tenir en compte que aquesta polarització és reversible (Ferrante i Leibovich, 2012; Arango Duque i Descoteaux, 2014; Colin et al., 2014; Martinez i Gordon, 2014; Murray et al., 2014; Zhou et al., 2014; Rószter, 2015). En condicions fisiològiques, els macròfags es troben polaritzats majoritàriament cap a M2, amb menys capacitat inflamatòria i més enfocats a la resolució de la inflamació, mentre que quan són activats, es polaritzen cap a M1, adquirint una alta activitat

proinflamatòria mitjançant la secreció de citocines i interleucines que permeten el reclutament i activació d'altres cèl·lules del sistema immunitari així com una elevada producció de ROS (Arango Duque i Descoteaux, 2014). Tanmateix, estudis recents posen en dubte aquesta classificació clàssica de macròfags M1 i M2. En aquest sentit, es proposa un altre tipus d'identificació menys binària i més basada en les principals funcions dels macròfags (defensa, reparació de lesions i regulació immunològica), que poden anar modulant de manera gradual segons l'entorn on es troben i que no necessàriament s'encasellen en M1 o M2 (Mosser i Edwards, 2008).



2. OBJECTIUS

El ràpid desenvolupament de la indústria avícola en els darrers 40 anys, junt amb l'alta demanda de producte ha fet que la suplementació de les dietes d'animals de granja amb additius com vitamines, enzims, antioxidants etc., sigui una pràctica habitual. El Se és un micronutrient essencial que juga un paper important en humans i animals a través de la seva incorporació a les selenoproteïnes en forma de Sec. Una aportació inadequada de Se a la dieta es considera un factor de risc per a diverses malalties cròniques associades a l'estrès oxidatiu i a la inflamació. Així, la seva incorporació com a additiu en les dietes per a aviram s'ha convertit en una forma eficaç de disminuir els efectes negatius de l'estrès causat als animals per l'augment dels paràmetres de producció (Surai, 2006). En aquest àmbit, l'origen de les diferents formes de Se presents a les dietes ha estat objecte de debat des que l'any 1974 es va autoritzar l'ús de fonts inorgàniques de Se. És per aquest motiu que des d'aleshores, s'ha desenvolupat una intensa recerca per trobar noves formes alternatives de Se, tant inorgàniques com orgàniques, per la suplementació dels pinsos.

L'objecte d'estudi d'aquesta tesi ha estat una font orgànica de Se incorporada fa pocs anys al mercat. Es tracta de l'hidroxianàleg de la Se-Met, l'HMSeBA.

El principal objectiu ha estat estudiar la capacitat de les cèl·lules epitelials de l'intestí i dels macròfags per a utilitzar aquesta font de Se per a la síntesi de selenoproteïnes. Es tracta de dos tipus cel·lulars sotmesos a condicions d'estrès oxidatiu, l'epiteli pel contingut intestinal i els macròfags arrel de la seva activació, en els que la participació de les selenoproteïnes com a antioxidants poden exercir un paper protector important.

Per assolir aquest objectiu, s'han utilitzat dues línies cel·lulars: les cèl·lules intestinals Caco-2, com a model d'epiteli intestinal, i les cèl·lules THP-1 com a model de macròfags. Les cèl·lules Caco-2 provenen d'un adenocarcinoma de còlon humà i cultivades en les condicions adients es diferencien i presenten moltes de les propietats bioquímiques, morfològiques i funcionals dels enteròcits de l'intestí prim (Hidalgo et al., 1989). Pel que fa a les cèl·lules THP1, provenen d'una línia immortal de monòcits

humans que es poden diferenciar en macròfags en presència d'un estímul com és el cas de l'activació de la proteïncinasa C (Kim et al., 2011).

D'aquest objectiu general, se'n deriven els següents objectius específics:

1. Estudi en cèl·lules intestinals Caco-2

- **Establiment del model de privació de Se en cèl·lules Caco-2.** Posar a punt un model de privació de Se que permeti posar de relleu els efectes de la manca de Se sobre l'expressió de selenoproteïnes i sobre l'estrès oxidatiu a l'epiteli intestinal.
- **Efecte de la suplementació amb diferents fonts de Se en el model de privació de Se en cèl·lules Caco-2.** Determinar si les cèl·lules Caco-2 utilitzen l'HMSeBA com a font de Se i si aquest pot prevenir els efectes de la privació de Se sobre la síntesi de selenoproteïnes i l'estrès oxidatiu. Aquests resultats s'han comparat amb els obtinguts amb la suplementació amb Se-Met i SS.
- **Efecte de la suplementació amb diferents fonts de Se sobre la producció de ROS, peroxidació lipídica i dany proteic induït per H₂O₂ en cèl·lules Caco-2.** Estudiar si la suplementació de les cèl·lules Caco-2 privades de Se amb HMSeBA té un efecte protector sobre l'estrès oxidatiu ocasionat per ROS. Aquests resultats s'han comparat amb els obtinguts amb SS.
- **Efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre la producció de ROS induïda per *Salmonella* Enteritidis.** Estudiar si la suplementació de les cèl·lules Caco-2 privades de Se amb HMSeBA té un efecte protector sobre l'estrès oxidatiu ocasionat per *Salmonella* Enteritidis.

2. Estudi en macròfags derivats de monòcits THP-1

- **Establiment del model de privació de Se en macròfags.** Posar a punt un model de privació de Se que permeti posar de relleu els efectes de la manca de Se sobre l'expressió de selenoproteïnes i sobre l'estrès oxidatiu en macròfags.
- **Efecte de la suplementació amb HMSeBA en el model de privació de Se en macròfags.** Determinar si els macròfags utilitzen l'HMSeBA com a font de Se i

si aquest pot prevenir els efectes de la privació de Se sobre la síntesi de selenoproteïnes i l'estrès oxidatiu.

- **Efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre la producció de ROS induïda per H₂O₂ en macròfags.** Estudiar si la suplementació dels macròfags privats de Se amb HMSeBA té un efecte protector sobre l'estrès oxidatiu ocasionat per ROS.
- **Efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre l'expressió gènica de GPX1, la producció de ROS, la producció de citocines i la capacitat fagocítica i bactericida en macròfags estimulats amb lipopolisacàrid (LPS).** Estudiar si la suplementació de macròfags privats de Se amb HMSeBA i estimulats amb LPS té un efecte modulador sobre l'estrès oxidatiu i la resposta immunitària. Aquests resultats s'han comparat amb els obtinguts amb l'N-acetilcisteïna (NAC).



3. MATERIAL I MÈTODES

3.1. Estudi en cèl·lules intestinals Caco-2

3.1.1. Materials

El medi *Dubelcco's Modified Eagle* (DMEM), la tripsina, el *TRI-Reagent*[®], la penicil·lina i l'estreptomicina han estat subministrats per *Life Technologies* (Carlsbad, CA, EUA). Els aminoàcids no essencials, la solució salina amortidora de fosfats estèril (*Dubelcco's Phosphate Buffered Saline*, PBS, pH 7,3), l'SS, la Se-Met i la resta de reactius generals han estat subministrats per *Sigma* (St. Louis, MO, EUA). El sèrum fetal boví (FBS) s'ha adquirit a *GE Healthcare Life Sciences* (Issaquah, WA, EUA). L'HMS₂SeBA (*Selisseo*[®]) ha estat cedit per *Adisseo France SAS* (Antony, França). L'utilitatge i els diferents suports per als cultius cel·lulars s'han obtingut a *Costar* (Cambridge, MA, USA). Les cèl·lules Caco-2 s'han obtingut de l'*European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, Salisbury, Regne Unit). La soca de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis, fagotip 4; soca resistent a l'àcid nalidíxic) ha estat cedida pel Dr. Ignacio Badiola, del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA, IRTA-UAB, Bellaterra, Espanya).

3.1.2. Cultiu de cèl·lules Caco-2

Les cèl·lules Caco-2 (passatges 52 i 75) s'han fet créixer de manera rutinària seguint el procediment descrit per Martin-Venegas et al. (2013). Les cèl·lules es sembren primerament en flascons de plàstic de 25 cm² (flascó de manteniment) a una densitat de 10.000 cèl·lules/cm² i es mantenen en un incubador (*INCOmed 246, Memmert*, Schwabach, Alemanya) a 37 °C en una atmosfera modificada amb un 5 % de CO₂. Una vegada assoleixen el 80 % de confluència, es disgreguen del suport per tripsinització amb l'objectiu de ressemmbrar el cultiu amb finalitats experimentals o de manteniment. La tripsina és un enzim que permet la disgregació de la matriu d'unió establerta entre les cèl·lules i el suport, així com la disgregació de les unions intercel·lulars, de manera que s'obté una suspensió cel·lular. La tripsina s'inactiva amb l'addició de DMEM que

conté FBS. Cada vegada que es realitza aquest procediment s'obté un passatge cel·lular nou. Una vegada obtinguda la suspensió cel·lular, es procedeix al recompte de cèl·lules viables per tal de ressemar les cèl·lules en el suport adequat i a la densitat apropiada (tal i com s'indica al següent apartat) segons l'experiment a realitzar.

3.1.3. Ressebra de cèl·lules Caco-2

Les cèl·lules Caco-2 es ressemen a partir de la suspensió obtinguda del flascó de manteniment en diferents suports (Figura 10): en flascons de 75 cm² (A) a una densitat de 10.000 cèl·lules/cm² o bé en plaques de 24 pous (B) a una densitat de 10.000 cèl·lules/cm².

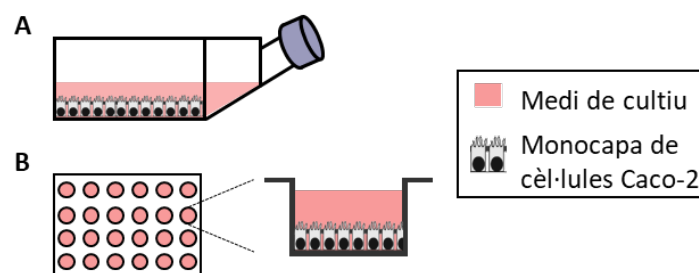


Figura 10. Esquema dels diferents suports utilitzats per la ressebra de les cèl·lules Caco-2: flascó de 75 cm² (A) i placa de 24 pous (B).

3.1.4. Composició dels medis de cultiu de cèl·lules Caco-2

S'han utilitzat diferents medis de cultiu, la composició dels quals s'indica a continuació:

Medi control: DMEM estàndard amb 4,5 g/L de D-glucosa i 2 mM d'L-glutamina, suplementat amb 10 % (v/v) d'FBS inactivat per calor, 100 UI/mL de penicil·lina, 100 µg/mL d'estreptomicina i un 1 % (v/v) d'aminoàcids no essencials. L'única font de Se present al medi de cultiu cel·lular prové de l'FBS, en forma de Se-Met. S'han analitzat

els dos lots d’FBS utilitzats en aquest estudi per espectrometria de masses per plasma d’acoblament inductiu (ICP-MS) als Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB, Barcelona, Espanya) i la concentració de Se (mitjana \pm error estàndard) ha estat de $153 \pm 3,6$ nM ($n = 6$). Per tant, la concentració de Se (mitjana \pm error estàndard) al DMEM un cop suplementat amb FBS és de $13,9 \pm 0,3$ nM.

Medi sense Se: medi control sense FBS. El medi no es complementa amb FBS ja que és la font que aporta Se al medi de cultiu.

Medi suplementat amb Se: medi sense Se suplementat amb diferents concentracions d’HMSeBA ($12,5$ - 1.250 μ M), SS (5 - 50 μ M) o Se-Met (250 μ M).

3.1.5. Model de privació de Se en cèl·lules Caco-2

Per establir el model de privació de Se (Figura 11), les cèl·lules Caco-2 s’han mantingut en medi control o en el medi sense Se. En aquests experiments, la condició (+)FBS fa referència a cultius mantinguts amb medi control durant 14 dies. En canvi, la condició (-)FBS fa referència a cultius mantinguts amb medi control durant 8 dies (per permetre a l’epiteli arribar a la confluència) i amb medi sense Se durant 6 dies més (14 dies en total).

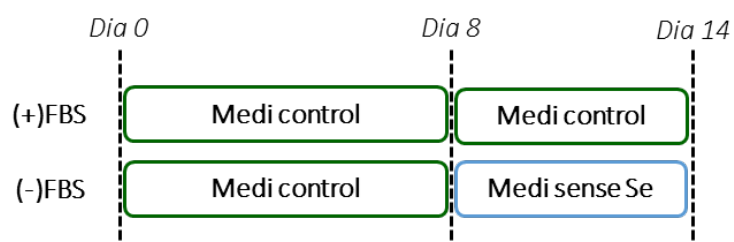


Figura 11. Disseny experimental del model de privació de Se en cèl·lules Caco-2.

El possible efecte citotòxic de la privació de Se s’ha avaluat mitjançant la determinació de l’activitat de l’enzim lactat-deshidrogenasa (LDH) total així com també l’activitat

LDH relativa al medi d'incubació amb el *kit* comercial *LDH Cytotoxicity Assay Kit* (*BioChain Institute Inc.*, Newark, CA, EUA). Després de recollir la mostra per la determinació de l'activitat LDH relativa al medi d'incubació, les cèl·lules es tracten amb tritó 0,5 % durant 15 minuts, la suspensió obtinguda es centrifuga a 9.600 *g* durant 5 min a 4 °C (*Accuspin Micro 17R*, *Fisher Scientific*, Hampton, NH, EUA) i l'activitat LDH total es determina al sobrenedant. El fonament del *kit* (Figura 12) es basa en una reacció enzimàtica en la que l'LDH present al medi catalitza la conversió del lactat a piruvat gràcies a la reducció de NAD⁺ a NADH. L'oxidació de NADH per l'enzim diaforasa permet la reducció d'una sal de tetrazoli (INT, clorur de 2-[4-iodofenil]-3-[4-dinitrofenil]-5-feniltetrazoli) a formazan. L'absorbància del formazan, proporcional a l'activitat LDH present a la mostra, es mesura amb un colorímetre (*Sunrise*, *Tecan*, Grödig, Àustria) a una longitud d'ona de 490 nm.

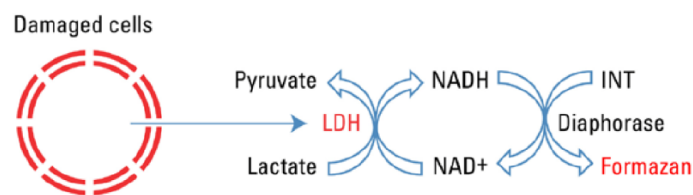


Figura 12. Fonament de la determinació de l'activitat LDH. Imatge extreta de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018500_CyQUANT-LDH-Cytotoxicity-Assay-Kit_PI.pdf.

3.1.6. Model de suplementació amb Se en cèl·lules Caco-2

Les cèl·lules mantingudes en el medi sense Se tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.1.5., es mantenen 72 h més (Figura 13) amb el medi sense Se [condició (-)FBS] o amb el medi suplementat amb Se (condició HMSeBA, Se-Met o SS).

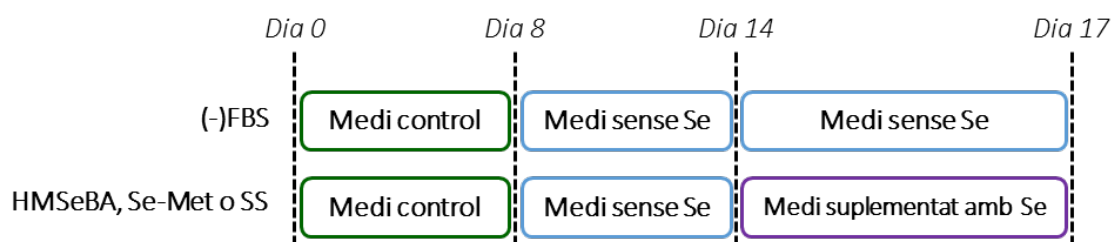


Figura 13. Disseny experimental del model de suplementació de Se en cèl·lules Caco-2.

El possible efecte citotòxic d'aquestes fonts de Se s'ha avaluat en cèl·lules mantingudes en un medi control suplementat amb Se mitjançant la determinació de l'activitat LDH al medi d'incubació per les cèl·lules no viables amb el *kit* comercial *LDH Cytotoxicity Assay Kit* (BioChain Institute Inc.).

3.1.7. Model d'estimulació amb H_2O_2 en cèl·lules Caco-2

Per al model d'estimulació dels cultius amb H_2O_2 (Figura 14), les cèl·lules mantingudes en el medi sense Se tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.1.5., s'incuben durant 24 h amb el medi sense Se [condició (-)FBS] o bé amb el medi suplementat amb Se (condició HMSeBA, Se-Met o SS). Seguidament, els cultius s'estimulen amb H_2O_2 (1 mM) durant un període addicional de 3 h.

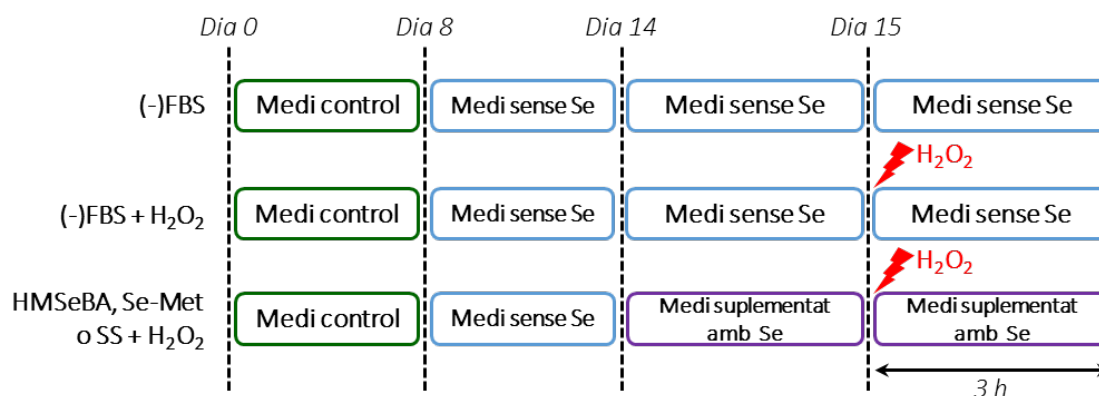


Figura 14. Disseny experimental del model d'estimulació amb H_2O_2 en cèl·lules Caco-2.

3.1.8. Model d'estimulació amb *Salmonella* Enteritidis en cèl·lules Caco-2

Per preparar l'inòcul de *Salmonella* Enteritidis, 24 h abans del dia de l'experiment, el bacteri es fa créixer en un medi enriquit (*Tryptone Soy Agar*, TSA, *Oxoid Termofisher*, Hampshire, Anglaterra) en una estufa a 37 °C (*Heraeus D-6540*, *Heraeus*, Hanau, Alemanya). El dia de l'experiment, es prepara l'inòcul de *Salmonella* Enteritidis a partir d'una suspensió del bacteri en PBS, a una densitat òptica compresa entre 0,8 i 1 a 600 nm.

Per al model d'estimulació amb *Salmonella* Enteritidis (Figura 15), les cèl·lules mantingudes tal com s'ha descrit a l'apartat 3.1.5., s'incuben durant 24 h amb el medi sense Se [condició (-)FBS] o bé amb el medi suplementat amb Se (condició HMSeBA, Se-Met o SS). Posteriorment, els cultius s'incuben amb la suspensió de *Salmonella* Enteritidis durant 3 h (*Series 8000 WJ CO₂ Incubator*, *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA, EUA). La *Salmonella* Enteritidis s'afegeix al cultiu a una multiplicitat d'infecció (MOI, nombre de bacteris per cèl·lula Caco-2) de 10.

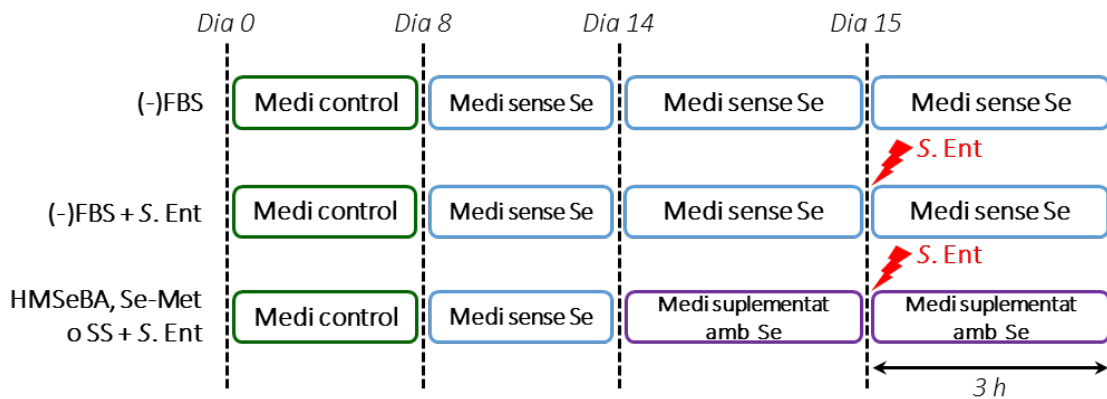


Figura 15. Disseny experimental del model d'estimulació amb *Salmonella* Enteritidis (*S. Ent*) en cèl·lules Caco-2.

3.1.9. Determinació de l'activitat GPX i TXNRD, expressió proteica de SELENOP i expressió gènica de SELENOP, GPX1 i GPX2 en cèl·lules Caco-2

3.1.9.1. Obtenció de les mostres

Per aquests experiments, les cèl·lules s'han mantingut en flascons de 75 cm². Un cop transcorregut el temps d'incubació corresponent, es procedeix a rentar 2 vegades els flascons amb PBS a 4 °C. Posteriorment, les cèl·lules es desenganxen de la base del flascó amb l'ajuda d'una rasqueta i es recullen amb 600 µl de PBS. Amb l'objectiu de lissar les cèl·lules, aquestes es sotmeten a una sonda d'ultrasons (40 pulsacions a 4 °C, *Soniprobe, Dawe Instruments Limited, Brentford, Regne Unit*). Seguidament, la suspensió obtinguda es centrifuga a 9.600 *g* durant 5 min a 4 °C (*Accuspin Micro 17R, Fisher Scientific*). Tant el sobrenedant com el sediment (*pellet*) obtingut s'emmagatzemen per separat a -80 °C fins al dia de la determinació. L'activitat GPX, l'activitat TXNRD i l'expressió proteica de SELENOP s'ha determinat al sobrenedant de les mostres recollides en el model de privació de Se i en el model de suplementació amb Se. L'expressió gènica de SELENOP, GPX1 i GPX2 s'ha determinat al *pellet* de les mostres recollides en els mateixos models indicats anteriorment.

3.1.9.2. Determinació de l'activitat GPX

L'activitat GPX s'ha determinat utilitzant el *kit* comercial *Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA)*. El fonament del *kit* (Figura 16) es basa en la determinació de l'activitat enzimàtica GPX de manera indirecta a través d'una reacció acoblada a l'enzim GR. La GPX present al sobrenedant redueix els peròxids d'hidrogen (R-O-O-H) oxidant el GSH a la seva forma oxidada (GSSG). El GSSG format és reduït novament a GSH per l'enzim GR gràcies a l'oxidació de NADPH a NADP⁺. Les unitats de l'activitat GPX es defineixen com la quantitat d'enzim que produeix l'oxidació d'1 nmol de NADPH a NADP⁺ per minut a 25 °C. La disminució de l'absorbància per minut del sobrenedant produïda per l'oxidació del NADPH es

determina a una longitud d'ona de 340 nm (*Benchmark Plus Reader, BioRad, Hercules, CA, EUA*).

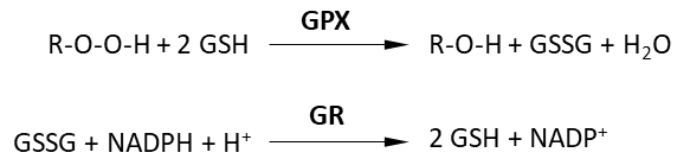


Figura 16. Fonament de la determinació de l'activitat glutatió-peroxidasa (GPX). Imatge extreta de <https://www.caymanchem.com/pdfs/703102.pdf>.

3.1.9.3. Determinació de l'activitat TXNRD

L'activitat TXNRD s'ha determinat utilitzant el *kit* comercial *Thioredoxin Reductase Assay Kit (Sigma)*. El fonament del *kit* (Figura 17) es basa en la reducció per part de l'enzim TXNRD de l'àcid 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoic) (DTNB) a àcid 5-tio-2-nitrobenzoic (TNB). Les unitats de l'activitat TXNRD es defineixen com la quantitat d'enzim que produeix la formació de 2 µmol de TNB per minut a 22 °C. L'increment de l'absorbància per minut del sobrenedant produïda per la presència de TNB es determina a una longitud d'ona de 412 nm (*Sunrise, Tecan*).

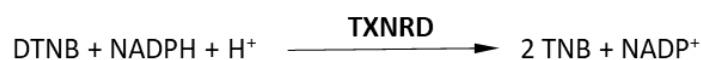


Figura 17. Fonament de la determinació de l'activitat tioredoxina-reductasa (TXNRD).

3.1.9.4. Determinació de l'expressió proteica de SELENOP

L'expressió proteica de SELENOP s'ha determinat utilitzant el *kit* d'enzimimmunoassaig (ELISA) sobre fase sòlida de tipus sandvitx *Human Selenoprotein P (SEPP1) ELISA Kit (Cusabio, Wuhan, Xina)*. El *kit* permet la unió de la SELENOP del sobrenedant als anticossos contra aquesta proteïna (anticòs anti-SELENOP) immobilitzats a la placa d'assaig. Posteriorment, s'afegeix un segon anticòs

anti-SELENOP conjugat amb biotina. Seguidament, s'afegeix l'enzim peroxidasa de rave (*horseradish peroxidase*, HRP) conjugat amb avidina, que s'uneix a la biotina. L'adició de tetrametilbenzidina (TMB) com a substrat de l'HRP produeix una reacció colorimètrica proporcional a la quantitat de SELENOP present a la mostra. L'absorbància es mesura a una longitud d'ona de 450 nm (*Sunrise, Tecan*).

3.1.9.5. Determinació de l'expressió gènica de GPX1, GPX2 i SELENOP

L'expressió gènica de GPX1, GPX2 i SELENOP s'ha determinat seguint el procediment descrit per Martin-Venegas et al. (2014). La determinació de l'expressió gènica comprèn tres processos que es descriuen a continuació.

En primer lloc, es fa una extracció de l'RNA total de la mostra utilitzant *TRI-Reagent*[®] i cloroform. Seguidament, es centrifuga la mostra a 12.000 *g* durant 15 min a 4 °C (*Accuspin Micro 17R, Fisher Scientific*) per tal de separar-la en 3 fases: una fase orgànica de color vermell (a la part inferior) que conté proteïnes i greixos principalment; una interfase amb DNA (anell blanc) i una fase aquosa transparent (part superior) que conté l'RNA. Després de la separació de la fase aquosa per aspiració i per tal de precipitar l'RNA, s'addiciona 2-propanol (isopropanol) i es centrifuga a 12.000 *g* durant 10 min a 4 °C (*Accuspin Micro 17R, Fisher Scientific*). El precipitat es purifica amb un rentat amb etanol al 70 % seguit d'una centrifugació a 7.500 *g* durant 5 min a 4 °C (*Accuspin Micro 17R, Fisher Scientific*). El precipitat es deixa assecar completament sota campana de flux laminar, posteriorment es resuspèn en 50 µL d'aigua ultrapura tractada amb dietilpirocarbonat (H₂O-DEPC) i es guarda a -80 °C. La concentració de l'RNA obtingut es determina per absorbància (*NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, EUA*). La integritat de l'RNA es determina a partir de l'*RNA Integrity Number* (RIN) amb l'equip *Agilent BioAnalyzer* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA*) als CCiTUB. Només les mostres amb un RIN superior a 7 es consideren aptes per continuar amb el procediment.

En segon lloc, l'RNA es transcriu a cDNA utilitzant el *kit* comercial *High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies)*. El fonament del *kit* es basa en l'addició de l'enzim retrotranscriptasa, que en presència de trifosfats de desoxiribonucleòtids, permet la formació del cDNA. La reacció es duu a terme en un termociclador (*Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Alemanya*) amb agitació constant a 37 °C durant 60 min. La reacció s'inactiva incrementant la temperatura a 95 °C durant 5 min.

Finalment, l'expressió dels diferents gens es determina per PCR quantitativa a temps real (qPCR) als CCiTUB (*ABI Prism 7900 Real-Time PCR System, Life Technologies*), utilitzant sondes específiques per a cada gen (*SELENOP_selenoprotein P1, GPX1_glutathione peroxidase 1, GPX2_glutathione peroxidase 2, TaqMan Gene Expression Assays, Life Technologies*). Per tal de normalitzar els resultats d'expressió gènica s'ha utilitzat el gen de referència *RPLP0_ribosomal protein lateral stalk subunit P0 (Life Technologies)*. Les dades s'han obtingut amb el software 7500 Systems SDS Software Version 2.4 (*Life Technologies*) i es mostren com a expressió relativa.

3.1.10. Determinació de la producció de ROS intracel·lulars en cèl·lules Caco-2

La determinació de ROS intracel·lulars s'ha realitzat en cèl·lules Caco-2 sembrades en plaques de 24 pous en el model de privació de Se i en el model d'estimulació amb H₂O₂ i *Salmonella* Enteritidis. S'ha utilitzat el *kit* comercial *OxiSelect™ Intracellular ROS Assay Kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, EUA)*, seguint el mètode descrit per Brufau et al. (2016). El fonament del *kit* (Figura 18) es basa en la utilització d'una sonda fluorogènica que difon a través de la membrana cel·lular (diacetat de 2',7'-diclorodihidrofluoresceïna, DCFH-DA) i que és desacetilada per esterases cel·lulars per formar un compost no fluorescent (DCFH). A l'interior cel·lular, el DCFH és oxidat pel ROS, produint el compost fluorescent 2',7'-diclorodihidrofluoresceïna (DCF).

Un cop transcorregut el temps d'incubació pertinent, i abans de privar les cèl·lules de Se o d'afegir l'estímul, es retira el medi de les cèl·lules i es guarda per utilitzar-lo

posteriorment. Les cèl·lules es renten dues vegades amb PBS i s'incuben amb 250 μL de DCFH-DA 0,1 nM en un medi sense Se, durant 45 min a 37 °C i protegides de la llum. Seguidament, les cèl·lules es renten dos vegades amb medi sense Se i es torna a afegir el medi corresponent prèviament guardat. A partir d'aquest moment, es fa una mesura de la intensitat de fluorescència que correspon al temps 0 h, s'estimulen les cèl·lules i es fan mesures periòdiques a diferents temps segons el model experimental. La intensitat de fluorescència de les cèl·lules es determina amb un espectrofotòmetre de fluorescència (*Wallac 1420 Victor3, Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA*) a una longitud d'ona d'excitació i d'emissió de 480 i 535 nm, respectivament.

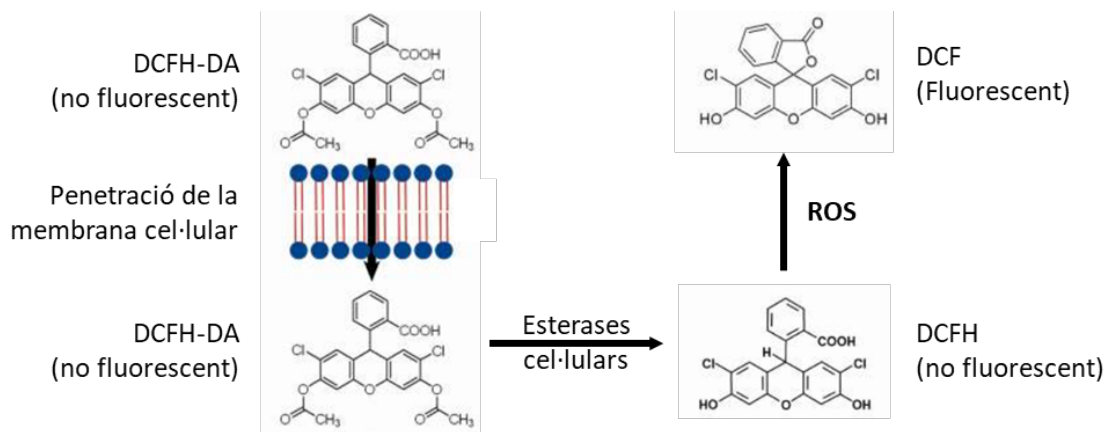


Figura 18. Fonament de la determinació d'espècies reactives d'oxigen (ROS). Imatge adaptada extreta de <https://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-342-ROS-assay-kit.pdf>.

3.1.11. Determinació de la carbonilació proteica i de la formació d'adductes hidroxinenals en cèl·lules Caco-2

3.1.11.1. Obtenció de les mostres

La determinació de la carbonilació proteica i de la formació d'adductes 4-hidroxinenal (4-HNE) es realitza en cèl·lules Caco-2 sembrades en plaques de 24 pous en el model d'estimulació amb H_2O_2 . Un cop transcorregut el temps d'incubació corresponent, es procedeix al rentat de la placa per duplicat amb PBS a 4 °C. Posteriorment, les cèl·lules

es desenganxen de la base de la placa amb l'ajuda d'una rasqueta i es recullen amb 150 µl de PBS. Amb l'objectiu de lisar les cèl·lules, aquestes es sotmeten a una sonda d'ultrasons (10 pulsacions a 4 °C, *Soniprobe, Dawe Instruments Limited*). Seguidament, la suspensió obtinguda es centrifuga a 9.600 *g* durant 5 min a 4 °C (*Accuspin Micro 17R, Fisher Scientific*) i s'emmagatzema a -80 °C fins el dia de la determinació.

3.1.11.2. Determinació de la carbonilació proteica

La determinació de la carbonilació proteica (derivació d'un grup carbonil en l'estructura de la proteïna ocasionada per l'estrès oxidatiu) es realitza utilitzant el *kit* d'ELISA sobre fase sòlida de tipus sandvitx *OxiSelect™ Protein Carbonyl ELISA Kit (Cell Biolabs Inc.)*. El fonament del *kit* (Figura 19) es basa en l'adsorció a la placa d'assaig de les proteïnes presents a la mostra (cal que totes les mostres continguin la mateixa concentració de proteïnes, que en aquest cas és de 10 µg/mL). Seguidament, s'afegeix a la placa 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) per tal de derivatitzar els grups carbonils a 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP). Les hidrazones formades són reconegudes per un anticòs anti-DNP. Aquest anticòs anti-DNP és reconegut per un segon anticòs conjugat amb HRP. L'addició de TMB com a substrat de l'HRP produeix una reacció colorimètrica proporcional a la quantitat de carbonilacions proteiques presents a la mostra. L'absorbància es mesura a una longitud d'ona de 450 nm (*Sunrise, Tecan*).

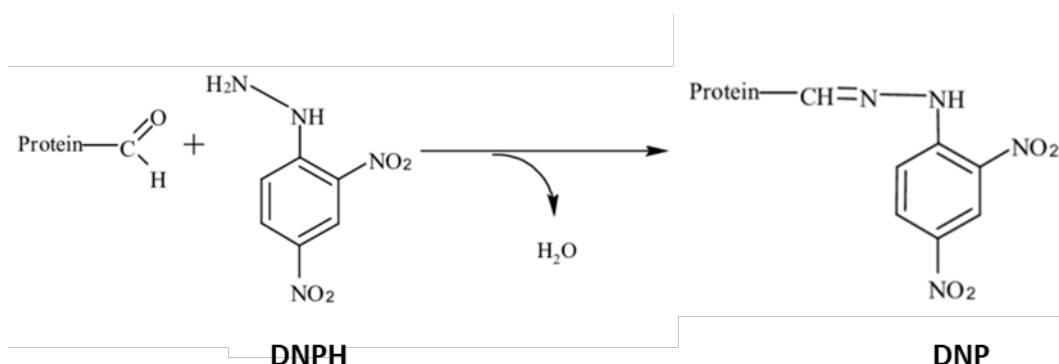


Figura 19. Fonament de la determinació de la carbonilació proteica (imatge adaptada de Nicoleta et al., 2014).

3.1.11.3. Determinació la formació d'adductes hidroxinenals

La determinació de la formació d'adductes hidroxinenals (majoritàriament de 4-HNE), productes secundaris de la peroxidació lipídica produïda per estrès oxidatiu, es realitza utilitzant el kit d'ELISA sobre fase sòlida de tipus sandvitx *OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA Kit* (Cell Biolabs Inc.). El fonament del kit (Figura 20) es basa en la capacitat del 4-HNE d'unir-se a les proteïnes per formar adductes més estables. Primerament s'adsorbeix a la placa d'assaig un conjugat HNE que permet posteriorment l'adsorció dels adductes 4-HNE presents a la mostra. Seguidament, s'afegeix un anticòs anti-HNE que reconeix els adductes de la mostra. Posteriorment, s'afegeix un anticòs secundari conjugat amb HRP. L'addició de TMB com a substrat de l'HRP produeix una reacció colorimètrica proporcional a la quantitat d'adductes 4-HNE presents a la mostra. L'absorbància es mesura a una longitud d'ona de 450 nm (Sunrise, Tecan).

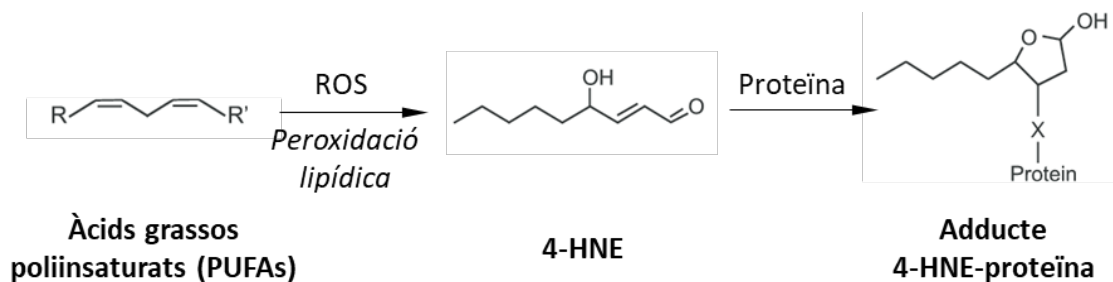


Figura 20. Fonament de la determinació d'adductes 4-HNE.

3.1.12. Determinació de concentració de proteïnes en cèl·lules Caco-2

La quantificació de proteïnes s'ha realitzat seguint el mètode descrit per Bradford (1976), utilitzant el reactiu *Bio-Rad*. Aquesta tècnica es basa en l'addició d'un colorant de naturalesa àcida (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) que reacciona amb les proteïnes, formant complexos colorimètrics relativament estables amb el pic d'absorbància a 595 nm. A partir d'una recta patró realitzada amb albúmina sèrica bovina (BSA) es calcula la concentració proteica de la mostra.

A cada mostra i a cada solució estàndard s'addiciona àcid fòrmic i s'agita. Seguidament, s'afegeix el colorant (reactiu *Bio-Rad* diluït 1:10), s'agita i es procedeix a la mesura de l'absorbància a una longitud d'ona de 595 nm (*Sunrise, Tecan*).

3.1.13. Determinació de la viabilitat de *Salmonella* Enteritidis

La viabilitat de *Salmonella* Enteritidis s'ha estudiat en presència d'HMSeBA. L'inòcul de *Salmonella* Enteritidis s'ha preparat tal i com s'ha descrit anteriorment (apartat 3.1.8.). Com a medi de cultiu s'utilitza DMEM estàndard sense cap tipus de suplementació (no conté antibiòtics). Seguidament, aquest medi es suplementa amb HMSeBA. L'experiment es duu a terme en una placa de 24 pous sense cèl·lules Caco-2 i, després de 3 h d'incubació amb l'inòcul de *Salmonella* Enteritidis (*Series 8000 WJ CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific*), s'obté una mostra del medi. Posteriorment, es procedeix a fer 6 sèries de dilucions 1:10 amb PBS. Les dilucions 5 i 6 es sembren per extensió en TSA i es mantenen 37 °C durant 24 h en un incubador (*Heraeus D-6540, Heraeus*) per permetre el creixement del bacteri. Posteriorment, es procedeix al recompte de les unitats formadores de colònies (UFC).

3.1.14. Anàlisi estadística

Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard. Les diferències significatives en els resultats s'han analitzat amb una ANOVA d'un factor (per als resultats de les Figures 26-28, 36 i de la Taula 4), seguit d'un test *post-hoc* de *Bonferroni* (per als resultats de les Figures 29-35), utilitzant el programari *SPSS* (*SPSS Inc., Chicago, IL, EUA*). En tots els casos, un valor de $P < 0,05$ denota diferència estadísticament significativa.

3.2. Estudi en macròfags derivats de monòcits THP-1

3.2.1. Materials

El medi *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI), els aminoàcids no essencials, el PBS, el β -mercaptoetanol, l'LPS d'*Escherichia coli* 0111:B4, la NAC, la BSA i el forbol-12-miristat-13-acetat (PMA) han estat subministrats per *Sigma*. El *TRI-Reagent*[®], la penicil·lina i l'estreptomicina han estat obtinguts a *Life Technologies*. El paraformaldehid (PFA) s'ha obtingut a *Electron Microscopy Sciences* (Hatfield, PA, EUA). El colorant *Hoechst* ha estat subministrat per *Honeywell Fluka* (Charlotte, NC, EUA). El medi de muntatge *ProLong Gold*[®] s'ha adquirit a *Invitrogen* (Waltham, MA, EUA). L'FBS s'ha adquirit a *GE Healthcare Life Sciences*. L'HMSeBA (Selisseo[®]) ha estat cedit per *Adisseo France SAS*. L'utilatge i els diferents suports per als cultius cel·lulars s'han obtingut a *Costar*. La línia cel·lular de monòcits humans THP-1 s'ha obtingut a l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA). La soca de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis, fagotip 4; soca resistent a l'àcid nalidíxic) ha estat cedida pel Dr. Ignacio Badiola del CReSA.

3.2.2. Cultiu de cèl·lules THP-1

Les cèl·lules THP-1 s'han fet créixer de manera rutinària seguint el procediment descrit per Brufau et al. (2017). Aquestes cèl·lules, sembrades a una dilució 1:3 del passatge anterior, es mantenen en suspensió en plaques de Petri en un incubador (*INCOmed 246, Memmert*) a 37 °C en una atmosfera modificada amb un 5 % CO₂.

3.2.3. Obtenció de macròfags

Un cop transcorreguts 4 dies de manteniment en les plaques de Petri, les cèl·lules es sembren en plaques de Petri o en plaques de 24 pous a una densitat de 300.000 cèl·lules/cm² o en plaques de 24 pous al damunt d'un suport de vidre (cobreobjectes)

a una densitat de 50.000 cèl·lules/cm² (Figura 21). Els cultius es mantenen en aquestes condicions durant 72 h en presència de 100 nM de PMA per tal d'activar la proteïnasa C (Kim et al., 2011) i així estimular la seva diferenciació a macròfags que queden adherits a la superfície de la placa de cultiu.

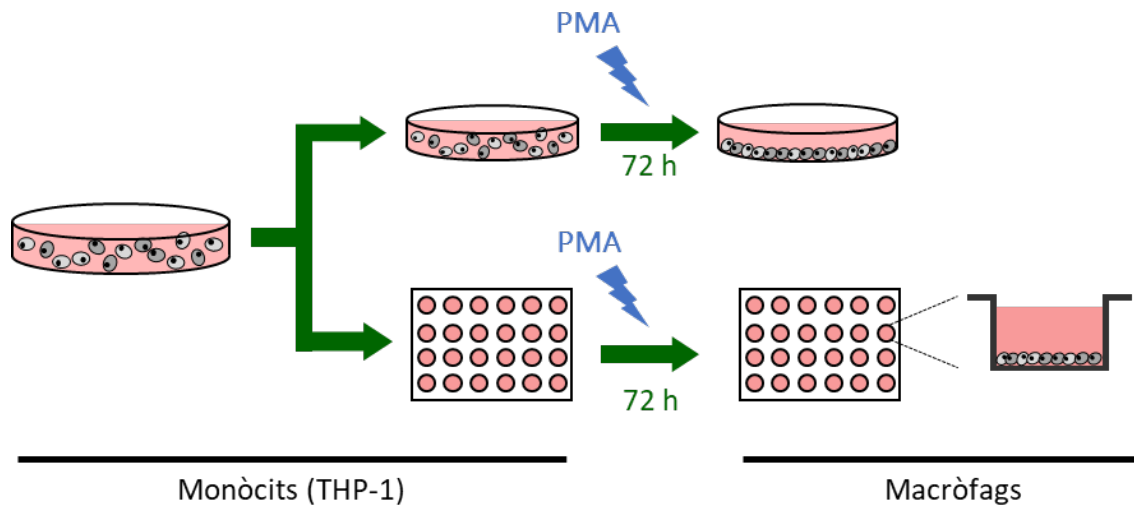


Figura 21. Esquema dels diferents suports utilitzats per a l'obtenció de macròfags (plaques de Petri i plaques de 24 pous).

3.2.4. Composició dels medis de cultiu de macròfags

S'han utilitzat diferents medis de cultiu, la composició dels quals s'indica a continuació:

Medi control: medi RPMI 1640 estàndard amb 2 mM de L-glutamina suplementat amb un 10 % (v/v) d'FBS inactivat per calor, 100 U/ml de penicil·lina, 100 µg/ml d'estreptomicina i 50 µM de β-mercaptoetanol. L'única font de Se present al medi de cultiu cel·lular prové de l'FBS, en forma de Se-Met. La concentració de Se a l'RPMI un cop suplementat amb FBS és la mateixa que la indicada a l'apartat 3.1.4. per al DMEM.

Medi control suplementat amb Se o NAC: medi control suplementat amb diferents concentracions d'HMSeBA (12,5 o 625 μ M) o NAC (10 mM), essent aquest últim utilitzat com antioxidant amb l'objectiu de comparar les dades.

Medi sense Se: medi control sense FBS. El medi no es complementa amb FBS ja que és la font que aporta Se al medi de cultiu.

Medi suplementat amb Se o NAC: medi sense Se suplementat amb diferents concentracions d'HMSeBA (12,5 o 625 μ M) o NAC (10 mM).

3.2.5. Model de privació de Se en macròfags

Per establir el model de privació de Se (Figura 22), els macròfags s'han mantingut en medi control o medi sense Se durant 6 o 24 h [condicions (+)FBS i (-)FBS, respectivament].

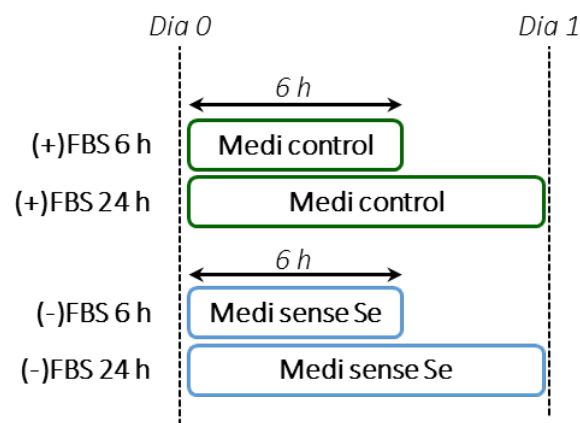


Figura 22. Disseny experimental del model de privació de Se en macròfags.

El possible efecte citotòxic de la privació de Se s'ha avaluat mitjançant la determinació de l'activitat de l'enzim LDH total així com també l'activitat LDH al medi d'incubació amb el *kit* comercial *LDH Cytotoxicity Assay Kit* (BioChain Institute Inc.) tal i com s'ha descrit prèviament a l'apartat 3.1.5.

3.2.6. Model de suplementació amb Se en macròfags

El model de suplementació amb Se s'ha desenvolupat en els cultius privats de Se només durant 24 h. Les cèl·lules mantingudes en el medi sense Se durant 24 h tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.2.5. [condició (-)FBS], s'incuben amb el medi suplementat amb Se (condició HMSeBA) durant 72 h (Figura 23).

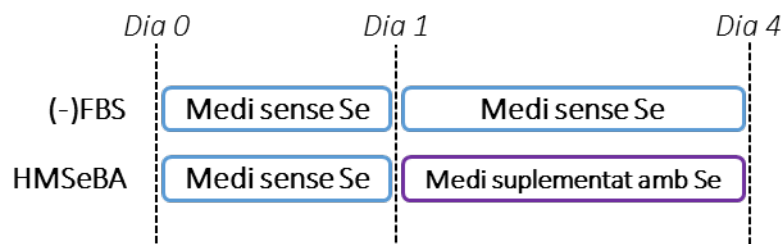


Figura 23. Disseny experimental del model de suplementació amb Se en macròfags.

El possible efecte citotòxic d'aquesta font de Se s'ha avaluat mitjançant la determinació de l'activitat LDH, tal i com s'ha descrit anteriorment a l'apartat 3.1.6.

3.2.7. Model d'estimulació amb H₂O₂ en macròfags

Per al model d'estimulació amb H₂O₂ (Figura 24), les cèl·lules mantingudes tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.2.6. [condicions (-)FBS o HMSeBA] s'estimulen amb H₂O₂ (1 mM) durant un període addicional de 4 h.

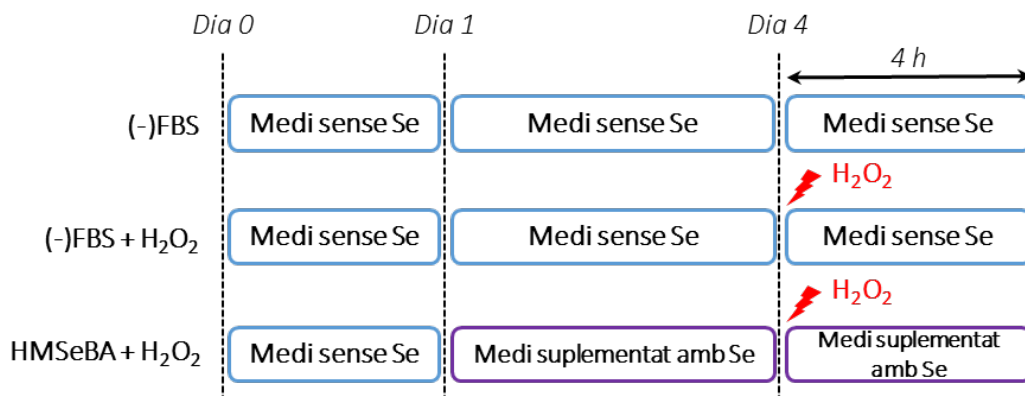


Figura 24. Disseny experimental del model d'estimulació amb H₂O₂ en macròfags.

3.2.8. Model d'estimulació amb LPS en macròfags

En aquest model (Figura 25) s'ha utilitzat tant cèl·lules mantingudes en medi control [condició (+)FBS] com en medi sense Se [condició (-)FBS]. Les cèl·lules, una vegada mantingudes en els medis respectius durant 24 h, s'incuben en el medi suplementat amb Se o amb NAC (condició HMSeBA o NAC) durant 24 h. Seguidament, les cèl·lules s'estimulen amb LPS a dos concentracions diferents (100 i 250 ng/mL) durant un període addicional de 4 o 24 h.

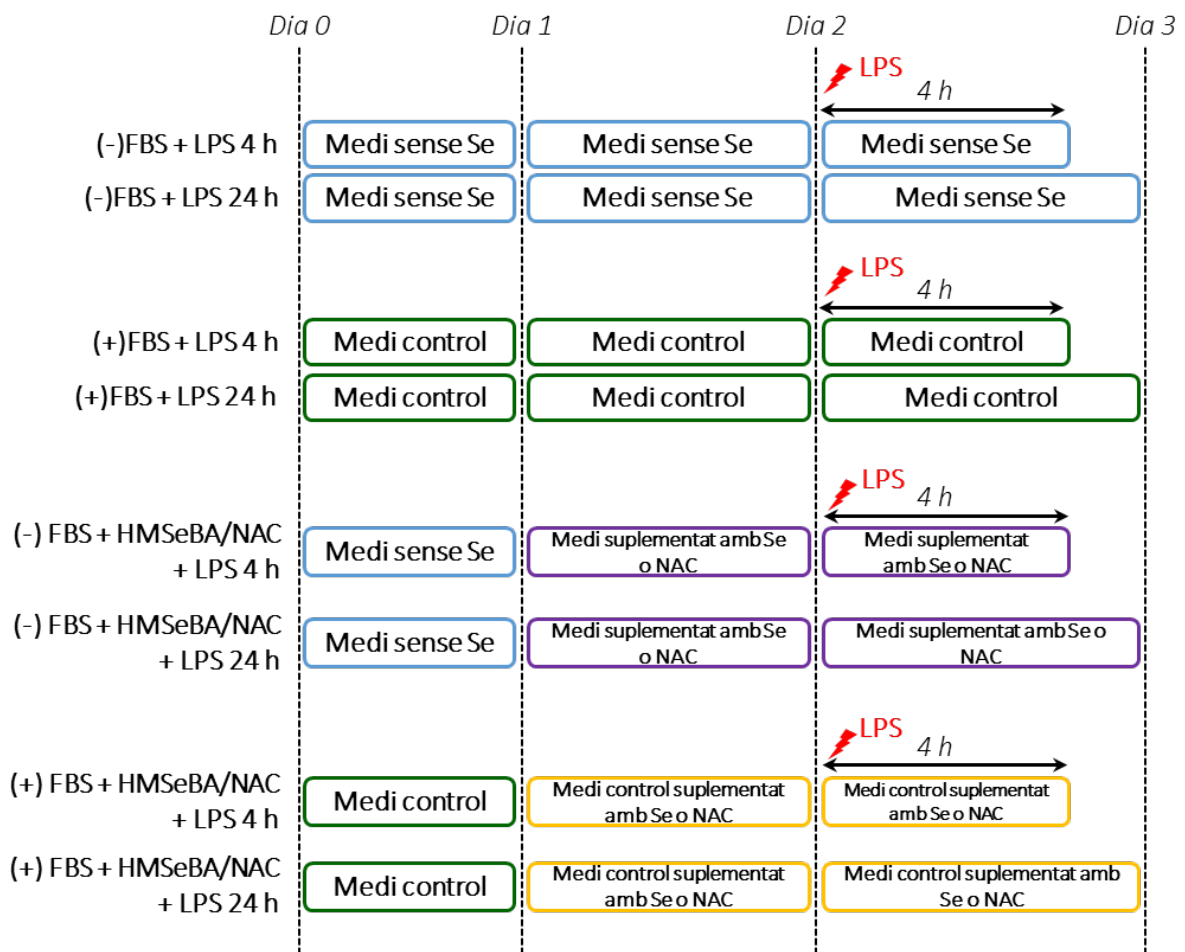


Figura 25. Disseny experimental del model d'estimulació amb LPS.

3.2.9. Determinació de l'activitat GPX, expressió proteica de SELENOP i expressió gènica de SELENOP i GPX1 en macròfags

3.2.9.1. Obtenció de les mostres

Un cop transcorregut el temps d'incubació corresponent, els macròfags sembrats en plaques de Petri es renten dos vegades amb PBS a 4 °C. Posteriorment, les cèl·lules es desenganxen del suport amb l'ajuda d'una rasqueta i es recullen amb 600 µl de PBS.

Per a la determinació de l'expressió gènica, aquestes cèl·lules es centrifuguen a 12.000 *g* durant 2 min a 4 °C, es recull el *pellet* i s'emmagatzema a -80 °C fins el dia de la determinació. L'expressió gènica de SELENOP i GPX1 s'ha determinat en el model de privació de Se i en el model de suplementació amb Se. L'expressió de GPX1 també s'ha determinat al model d'estimulació amb LPS.

En canvi, per a la determinació de l'activitat GPX i de l'expressió proteica de SELENOP, les cèl·lules es sotmeten a una sonda d'ultrasons (40 pulsacions a 4 °C, *Soniprobe, Dawe Instruments Limited*) per tal de lisar-les. Seguidament, la suspensió obtinguda es centrifuga a 9.600 *g* durant 5 min a 4 °C (*Accuspin Micro 17R, Fisher Scientific*) i el sobrenedant obtingut s'emmagatzema a -80 °C fins al dia de la determinació. L'activitat GPX i l'expressió proteica de SELENOP s'ha determinat en el model de privació de Se.

3.2.9.2. Determinació de l'activitat GPX i expressió proteica de SELENOP

L'activitat GPX i l'expressió proteica de SELENOP s'ha determinat seguint el procediment descrit als apartats 3.1.9.2. i 3.1.9.4., respectivament.

3.2.9.3. Determinació de l'expressió gènica de GPX1 i SELENOP

L'expressió gènica de GPX1 i SELENOP s'ha determinat seguint el procediment descrit a l'apartat 3.1.9.5.

3.2.10. Determinació de la producció de ROS intracel·lulars en macròfags

La determinació de ROS intracel·lulars es realitza en macròfags sembrats en plaques de 24 pous en el model de privació de Se i en el model d'estimulació amb H₂O₂ i LPS, seguint el procediment descrit a l'apartat 3.1.10.

3.2.11. Determinació de l'autofluorescència en macròfags

La determinació de l'autofluorescència emesa pels macròfags, sembrats en plaques de 24 pous sobre un cobreobjectes, es realitza en el model d'estimulació amb LPS com a indicador d'estrès oxidatiu. Una vegada les cèl·lules han estat estimulades amb LPS durant el temps pertinent, es renten 2 vegades amb PBS i es fixen amb PFA al 4 % (v/v) durant 15 min a temperatura ambient. Seguidament, les cèl·lules es renten dues vegades amb PBS i s'incuben en una solució de BSA 1 % (v/v) amb colorant *Hoechst* (4,16 µg/mL) per tenyir els nuclis cel·lulars. Una vegada finalitzada la tinció, es procedeix a retirar el cobreobjectes de la placa per fer el muntatge en un portaobjectes. S'afegeixen 10 µL de *ProLong Gold*[®] (medi de muntatge anti-decoloració) en forma de gota sobre el portaobjectes i, amb ajuda d'unes pinces, es col·loca el cobreobjectes amb els macròfags adherits de manera que quedin en contacte amb el medi de muntatge. Passades 48 h d'assecat, es determina l'autofluorescència de les mostres amb un microscopi confocal (*LSM 880, Zeiss, Alemanya*) a una longitud d'ona de 561 nm als CCI^{TUB}. Les imatges es processen amb el programari *ImageJ* (domini públic, *National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA*).

3.2.12. Determinació de la producció de citocines TNF α , IL-1 β i IL-10 en macròfags

La quantificació de les citocines TNF α , IL-1 β i IL-10 en el medi de cultiu es realitza en macròfags sembrats en plaques de 24 pous en el model d'estimulació amb LPS. S'han utilitzat 3 kits d'ELISA sobre fase sòlida de tipus sandvitx diferents: *Human TNF α ELISA Kit*, *Human IL-1 β ELISA Kit* i *Human IL-10 High Sensitivity Elisa Kit* (Diacclone, França). Els kits permeten la unió de la citocina de la mostra als anticossos contra aquesta citocina immobilitzats a la placa d'assaig. Posteriorment, s'afegeix un segon anticòs anti-citocina conjugat amb biotina. Seguidament, s'afegeix l'enzim HRP conjugat amb avidina, que s'uneix a la biotina. L'adició de TMB com a substrat de l'HRP produeix una reacció colorimètrica proporcional a la quantitat de citocina present a la mostra. L'absorbància es mesura a una longitud d'ona de 450 nm (*Sunrise, Tecan*).

3.2.13. Determinació de la capacitat fagocítica i bactericida en macròfags

La determinació de la capacitat fagocítica i bactericida dels macròfags sembrats en plaques de 24 pous es realitza en el model d'estimulació amb LPS. Després de l'estimulació amb LPS, les cèl·lules s'incuben amb l'inòcul de *Salmonella* Enteritidis a una MOI de 10 durant 3 h en un incubador a 37 °C (*Series 8000 WJ CO₂ Incubator, Thermo Fisher Scientific*), preparat tal i com s'ha descrit a l'apartat 3.1.8. La capacitat fagocítica i bactericida es determina a partir de la desaparició del bacteri del medi d'incubació o del contingut intracel·lular, respectivament. Passades les 3 h d'incubació amb *Salmonella* Enteritidis i per la determinació de la capacitat fagocítica, es recull una mostra del medi d'incubació i es realitzen tres sèries de dilucions 1:10 amb PBS. Per determinar la capacitat bactericida, les cèl·lules es mantenen durant 1 h amb RPMI estàndard suplementat amb 100 U/ml de penicil·lina i 100 μ g/ml d'estreptomicina, per tal d'eliminar els bacteris que no han penetrat a l'interior cel·lular. Seguidament, es renten les cèl·lules amb PBS i s'incuben amb una solució de Tritó al 0,5 % (v/v, en PBS) durant 15 min en un incubador a 37 °C (*Series 8000 WJ CO₂ Incubator, Thermo*

Fisher Scientific), per tal d'alliberar tot el contingut cel·lular. La suspensió obtinguda s'homogeneïtza amb ajut d'una pipeta i es realitzen cinc sèries de dilucions 1:10 amb PBS. Totes les mostres obtingudes es sembren per extensió en una placa de TSA i es mantenen en una estufa 37 °C (*Heraeus D-6540, Heraeus*) durant 24 h en un incubador, per permetre el creixement del bacteri. Posteriorment, es procedeix al recompte de les UFC.

3.2.14. Anàlisi estadística

Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard. Les diferències significatives en els resultats s'han analitzat amb una ANOVA d'un factor (per als resultats de les Figures 37-39, 42, 43 i de la Taula 5), seguit d'un test *post-hoc* de *Bonferroni* (per als resultats de les Figures 38-48), utilitzant el programari *SPSS (SPSS Inc.)*. En tots els casos, un valor de $P < 0,05$ denota diferència estadísticament significativa.



4. RESULTATS

4.1. Estudi en cèl·lules intestinals Caco-2

4.1.1. Model de privació de Se en cèl·lules Caco-2

La primera part de l'estudi va consistir en determinar l'efecte de la privació de Se en cèl·lules Caco-2 sobre l'expressió de diverses selenoproteïnes. Prèviament, es va determinar si la privació d'FBS podia tenir un efecte sobre la viabilitat del cultiu. La condició (-)FBS va mostrar una activitat LDH total del cultiu menor respecte la condició (+)FBS, fet que indicava un menor nombre de cèl·lules a la condició (-)FBS (Figura 26A). Tanmateix, els resultats de l'activitat LDH relativa al medi de cultiu van mostrar que la privació d'FBS no produïa un efecte citotòxic, ja que els valors obtinguts a la condició (-)FBS van ser, fins i tot, menors que els obtinguts a la condició (+)FBS (Figura 26B).

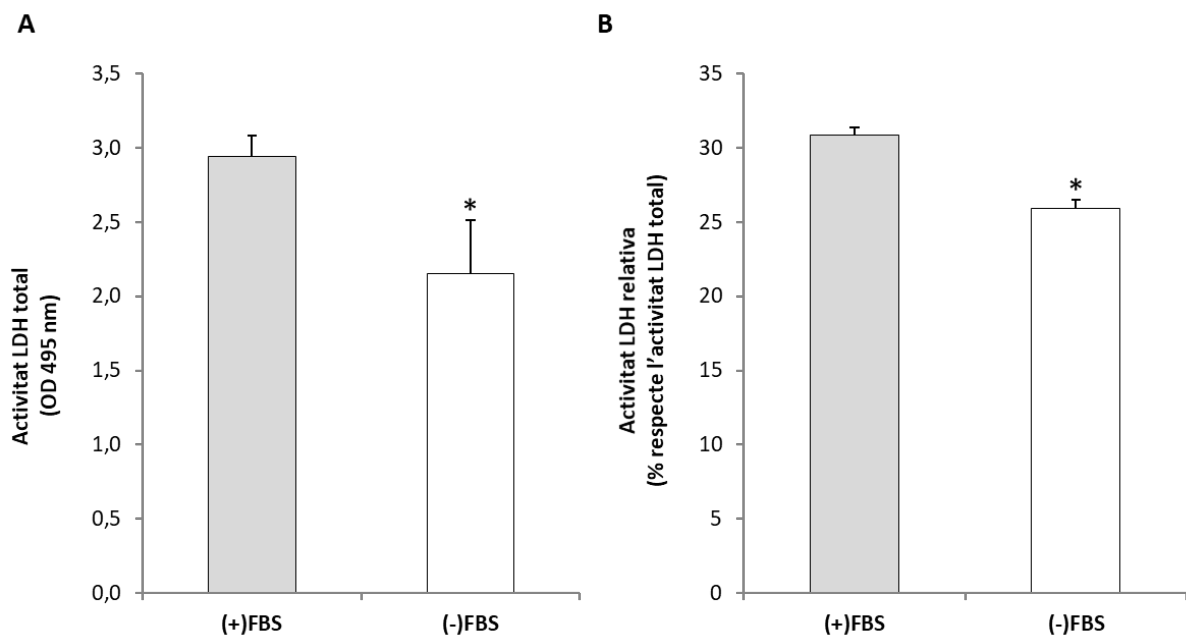


Figura 26. Activitat LDH en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control [(+)FBS] o en medi sense Se [(-)FBS]. (A) Activitat LDH total (activitat LDH al medi de cultiu + activitat LDH intracel·lular) i (B) activitat LDH relativa al medi de cultiu (expressada en % respecte l'activitat LDH total). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 12$ cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) respecte la condició (+)FBS.

La privació de Se en cèl·lules Caco-2 va provocar una reducció de l'activitat GPX (Figura 27A), que va anar acompanyada d'una disminució en l'expressió gènica de GPX1 (Figura 27B). En canvi, la isoforma GPX2 (Figura 27C) va veure incrementada la seva expressió. En quant a la SELENOP, tant l'expressió proteica (Figura 27D) com l'expressió gènica (Figura 27E) varen disminuir en el model de privació de Se. Finalment, l'activitat de l'enzim TXNRD (Figura 27F) no es va veure modificada per la privació de Se, tot i que els valors són més elevats en aquesta condició.

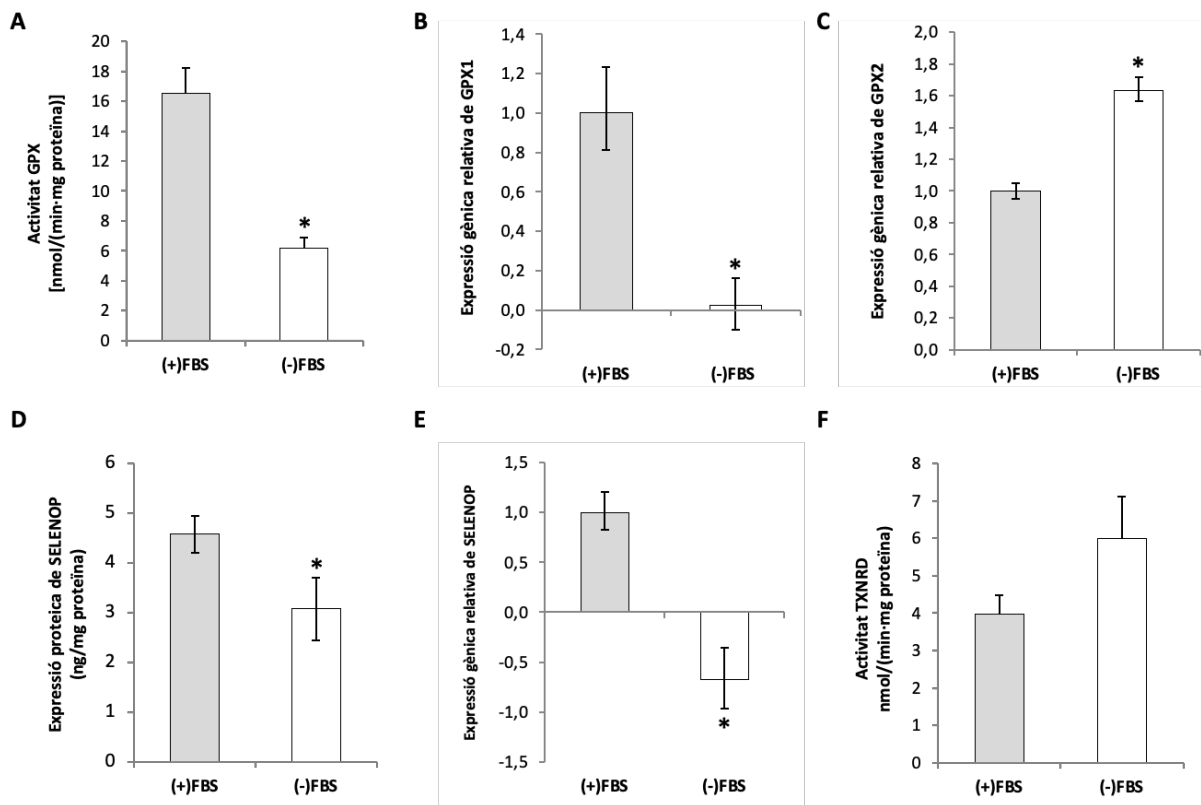


Figura 27. Activitat GPX (A), expressió gènica relativa de GPX1 (B), expressió gènica relativa de GPX2 (C), expressió proteica de SELENOP (D), expressió gènica relativa de SELENOP (E) i activitat TXNRD (F) en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control [(+)FBS] o en medi sense Se [(-)FBS]. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i es mostren com a % de variació respecte la condició (+)FBS. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 4 - 9 cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) respecte la condició (+)FBS.

A partir d'aquests resultats es pot determinar l'expressió relativa de les tres selenoproteïnes estudiades. L'anàlisi de les dades revela que l'expressió de SELENOP i GPX1 són similars, mentre que l'expressió de GPX2 és molt menor (Figura 28).

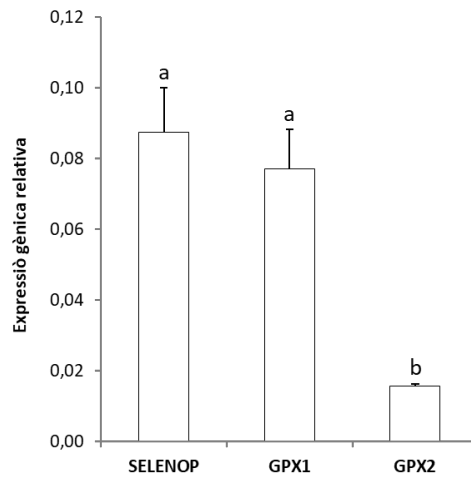


Figura 28. Expressió gènica relativa de SELENOP, GPX1 i GPX2 en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control [(+)FBS]. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta Ct}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 8$ cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$).

També es va determinar l'efecte de la privació de Se sobre la producció de ROS. En aquest cas es va observar un increment d'aquesta variable (Figura 29).

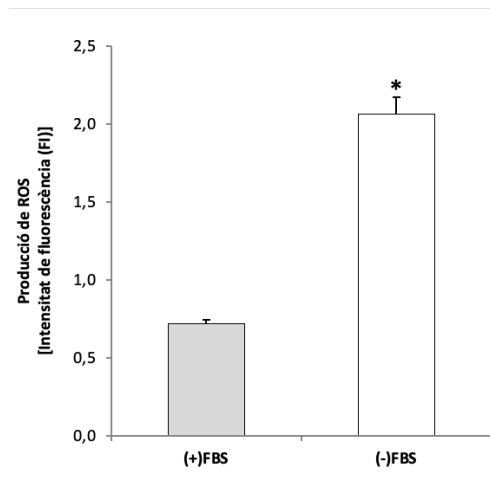


Figura 29. Producció de ROS en cèl·lules Caco-2 sembrades en medi control [(+)FBS] o en medi sense Se [(-)FBS]. Els resultats de producció de ROS es mostren com a intensitat de fluorescència (FI) obtinguda al final de l'experiment. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 9$ cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives ($p < 0,05$) respecte la condició (+)FBS.

4.1.2. Model de suplementació amb Se en cèl·lules Caco-2

Per la posta a punt del model de suplementació amb HMSeBA com a font orgànica de Se, es va fer un estudi previ on es va utilitzar la Se-Met, una font de Se orgànica molt estudiada i la principal font de Se present a l'FBS. Es va voler comprovar si la Se-Met era capaç de restablir l'expressió de les selenoproteïnes estudiades anteriorment després de mantenir les cèl·lules en medi sense Se (model de privació de Se). Els resultats obtinguts es mostren a la Taula 4.

Taula 4. Activitat LDH al medi de cultiu, activitat GPX, expressió gènica relativa de GPX1, expressió gènica relativa de GPX2, expressió proteica de SELENOP i expressió gènica relativa de SELENOP en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se [(-)FBS] o en medi suplementat amb Se (250 µM Se-Met) durant 72 h. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i es mostren com a % de variació respecte la condició (-)FBS. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 4 - 6$ cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) respecte la condició (-)FBS.

	(-)FBS	Se-Met
Activitat LDH [% respecte (-)FBS]	100,00 \pm 1,39	96,38 \pm 5,56
Activitat GPX [nmol/(min·mg proteïna)]	5,99 \pm 0,33	11,44 \pm 1,84*
Expressió gènica relativa de GPX1 [variació respecte (-)FBS]	1,00(0,94-1,05)	1,43(1,32-1,51)*
Expressió gènica relativa de GPX2 [variació respecte (-)FBS]	1,00(0,93-1,07)	1,76(1,61-1,85)*
Expressió proteica SELENOP [ng/mg proteïna]	3,26 \pm 0,21	5,95 \pm 1,01*
Expressió gènica relativa de SELENOP [variació respecte (-)FBS]	1,00(0,94-1,05)	1,54(1,45-1,61)*

Els resultats de l'activitat LDH al medi de cultiu després de la suplementació amb Se-Met no van mostrar diferències respecte la condició (-)FBS, fet que descarta un efecte citotòxic d'aquesta font a la concentració assajada. La suplementació amb Se-Met va

produir un increment de l'activitat GPX, de l'expressió gènica de GPX1, GPX2 i SELENOP, així com de l'expressió proteica de SELENOP.

Una vegada es va comprovar que la suplementació amb Se-Met incrementava tant l'activitat com l'expressió proteica i gènica d'aquestes selenoproteïnes, es va procedir a estudiar l'efecte de l'HMSeBA, en comparació amb una font inorgànica (SS). Prèviament, es va fer un estudi de citotoxicitat d'aquestes fonts. La suplementació de les cèl·lules Caco-2 amb l'SS durant 72 h va produir un increment de l'activitat LDH al medi de cultiu a partir de la concentració 12,5 μM . Tenint en compte aquests resultats, l'SS es va utilitzar en els experiments posteriors a una concentració màxima de 5 μM . En canvi, la suplementació amb HMSeBA no va comprometre la viabilitat cel·lular a cap de les concentracions assajades (Figura 30).

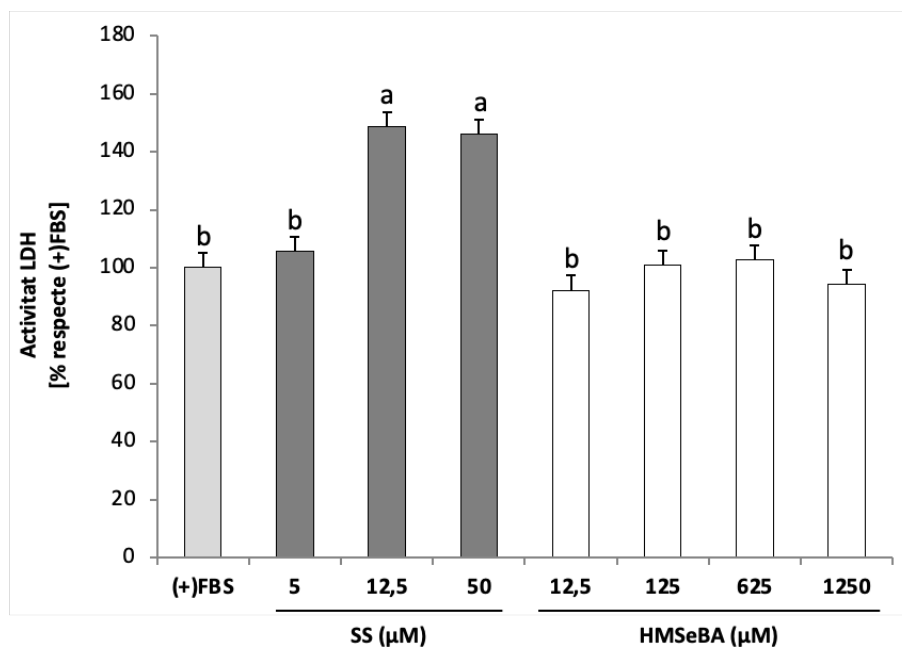


Figura 30. Activitat LDH al medi de cultiu de cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi control [(+)FBS] ($n = 12$) o en medi suplementat amb Se: 5 - 50 μM SS ($n = 4 - 6$) o 12,5 - 1250 μM HMSeBA ($n = 6 - 11$). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$).

Com es mostra a la Figura 31, els resultats de la suplementació amb SS posen de relleu un increment en l'activitat GPX. En el cas de la suplementació amb HMSeBA també s'observa un increment amb concentracions iguals o superiors a 12,5 μM en relació a la condició (-)FBS, arribant a assolir valors similars als obtinguts amb SS, excepte en el cas de 0,1 μM HMSeBA.

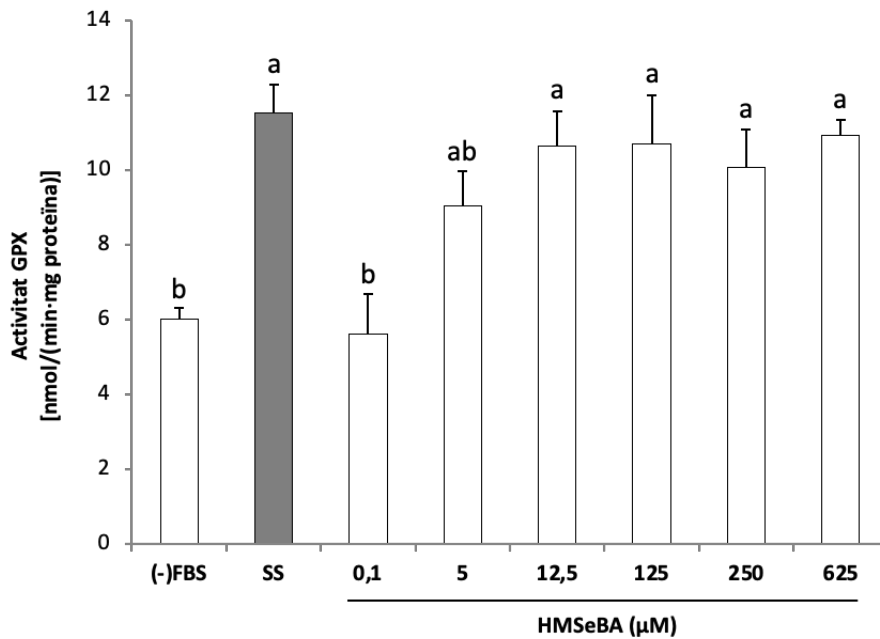


Figura 31. Activitat GPX en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se [(-)FBS] o en medi suplementat amb Se: 5 μM SS o 0,1 - 625 μM HMSeBA. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 4 cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives (P < 0,05).

Els experiments d'expressió gènica es van dur a terme amb dues concentracions d'HMSeBA, la més baixa (12,5 μM) i la més alta (625 μM) capaces d'incrementar l'activitat GPX. La suplementació amb l'HMSeBA va incrementar l'expressió gènica de GPX1 (12,5 i 625 μM) i GPX2 (625 μM) en comparació amb la condició (-)FBS (Figura 32A i 32B, respectivament). En ambdós casos, no es van observar diferències entre les condicions SS i (-)FBS.

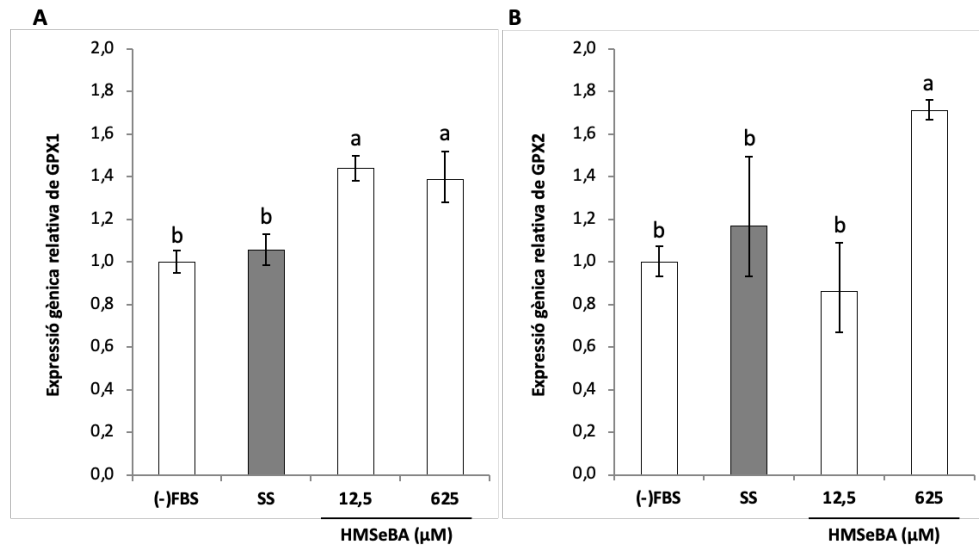


Figura 32. Expressió gènica relativa de GPX1 (A) i GPX 2 (B) en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se [(-)FBS] (n = 20) o en medi suplementat amb Se: 5 μM SS (n = 6) o 12,5 (n = 3) i 625 (n = 8) μM HMSeBA. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i es mostren com a % de variació respecte la condició (-)FBS. Els resultats s'expressen com a mitjana de la variació respecte (-)FBS \pm error estàndard de n cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$).

En el cas de l'expressió proteica de SELENOP (Figura 33), es va observar un increment d'aquesta variable amb les concentracions més altes d'HMSeBA (250 i 625 μM), en relació amb la condició (-)FBS, arribant a assolir valors similars als obtinguts amb la condició SS.

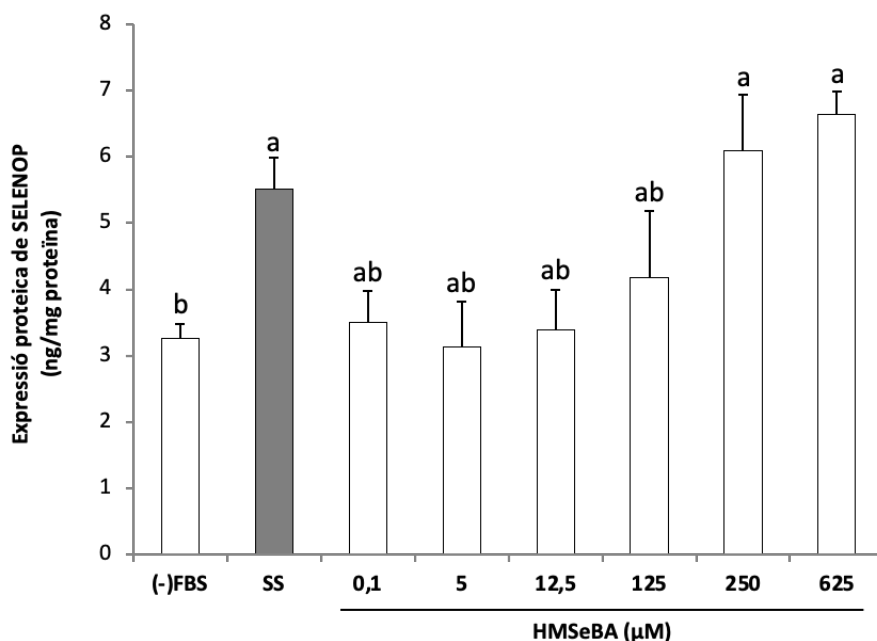


Figura 33. Expressió proteica de SELENOP en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se [(-)FBS] (n = 19) o en medi suplementat amb Se: 5 μM SS (n = 4 - 6) o 0,1 - 625 μM HMSeBA (n = 4 - 6). Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard de n cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives (P < 0,05).

De la mateixa manera que amb GPX1 i GPX2, l'expressió gènica de SELENOP es va estudiar suplementant les cèl·lules amb 12,5 i 625 μM d'HMSeBA (Figura 34). Els resultats mostren un increment d'aquesta variable amb les dues concentracions d'HMSeBA testades en comparació amb la condició (-)FBS. De nou, no es van observar diferències entre les condicions SS i (-)FBS.

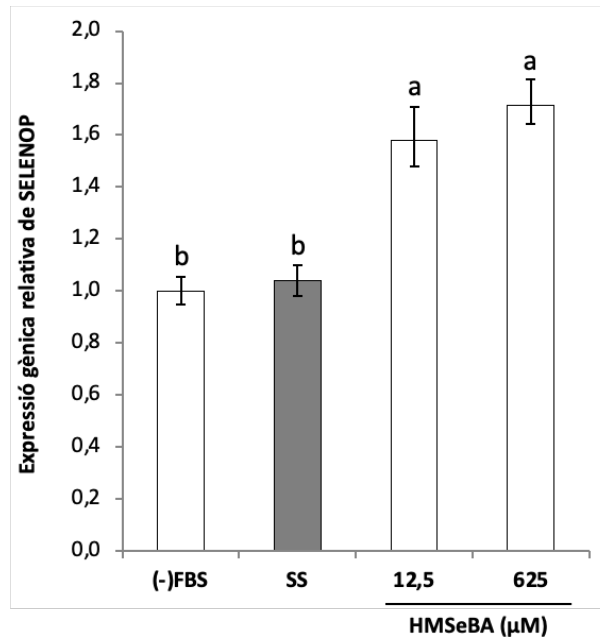


Figura 34. Expressió gènica relativa de SELENOP en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se [(-)FBS] o en medi suplementat amb Se: 5 µM SS o 12,5 i 625 µM HMSeBA. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i es mostren com a % de variació respecte la condició (-)FBS. Els resultats s'expressen com a mitjana de la variació respecte (-)FBS \pm error estàndard de n = 5 cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives (P < 0,05).

Encara que l'activitat TXNRD no es va veure modificada per la privació de Se, es va voler estudiar l'efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre l'activitat d'aquest enzim. En aquest cas, es va observar un increment significatiu de l'activitat TXNRD amb la suplementació amb HMSeBA a 12,5 µM [(-)FBS: $6,42 \pm 0,96$ nmol \cdot min⁻¹ \cdot mg proteïna⁻¹; 12,5 µM HMSeBA: $12,3 \pm 2,37$ nmol \cdot min⁻¹ \cdot mg proteïna⁻¹, mitjana \pm error estàndard de n = 4 i 5 cultius, respectivament, P < 0,05)].

4.1.3. Model d'estimulació amb H₂O₂ en cèl·lules Caco-2

Una vegada estudiat l'efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre l'expressió de les diferents selenoproteïnes, es va procedir a estudiar l'efecte protector d'aquesta font en comparació amb l'SS davant l'estrès oxidatiu, en el model d'estimulació amb H₂O₂. Es va avaluar l'efecte sobre la producció de ROS, així com també sobre la

formació de productes secundaris d'oxidació, com la formació d'adductes 4-HNE derivats de la peroxidació lipídica i la carbonilació proteica. L'estimulació de les cèl·lules (-)FBS amb H_2O_2 va incrementar significativament la producció de ROS (Figura 35A), la producció d'adductes 4-HNE (Figura 35B) i la carbonilació proteica (Figura 35C). En aquestes condicions, la suplementació amb 625 μM HMSeBA va contrarestar els efectes produïts per l' H_2O_2 , arribant a assolir els valors obtinguts en cèl·lules no estimulades excepte en el cas de la producció de ROS. La suplementació amb SS no va exercir un efecte protector en cap de les tres variables estudiades.

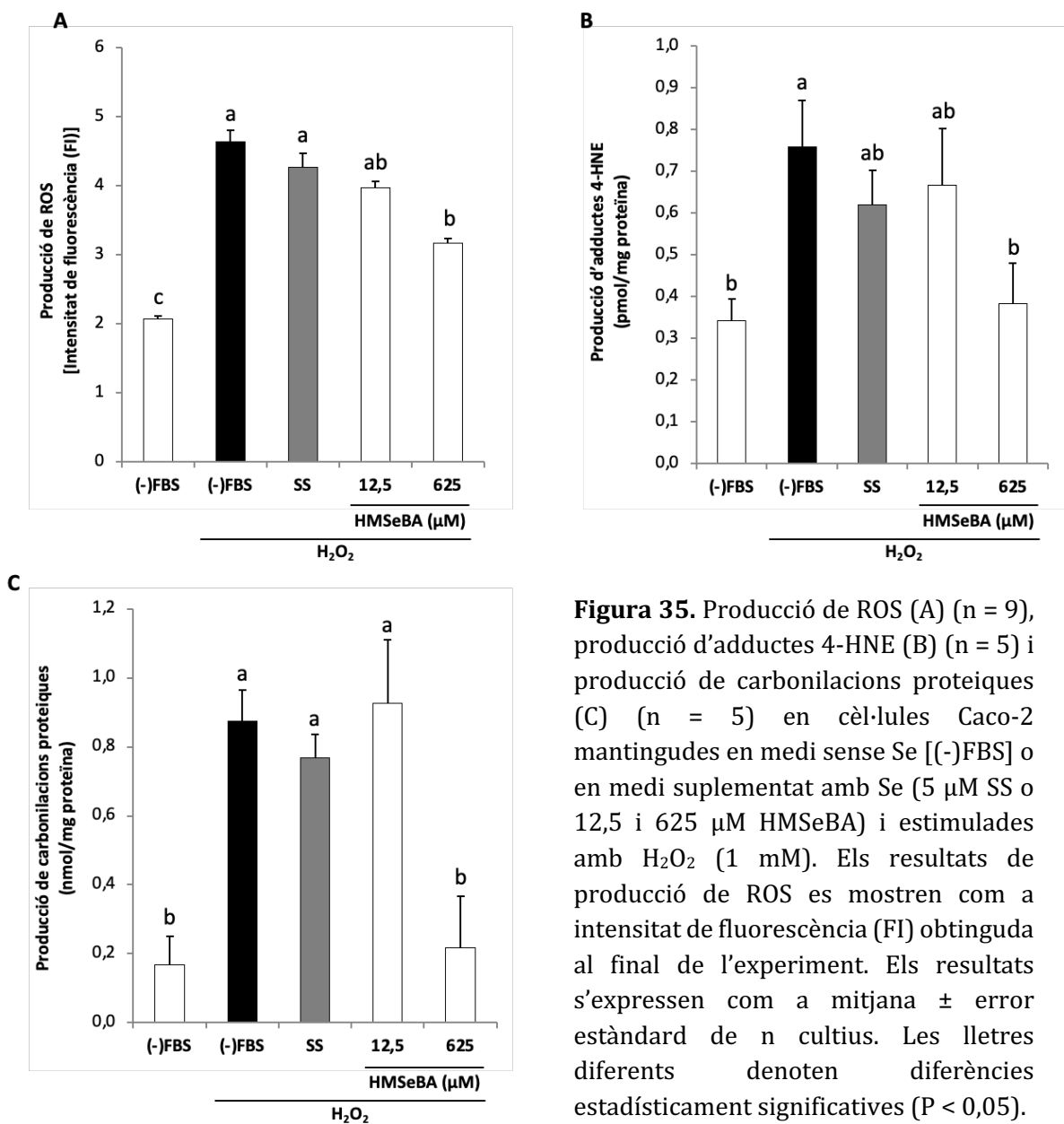


Figura 35. Producció de ROS (A) (n = 9), producció d'adductes 4-HNE (B) (n = 5) i producció de carbonilacions proteïques (C) (n = 5) en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se [(-)FBS] o en medi suplementat amb Se (5 μM SS o 12,5 i 625 μM HMSeBA) i estimulades amb H_2O_2 (1 mM). Els resultats de producció de ROS es mostren com a intensitat de fluorescència (FI) obtinguda al final de l'experiment. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$).

4.1.4. Model d'estimulació amb *Salmonella* Enteritidis en cèl·lules Caco-2

Atès que, a diferència de l'SS, la concentració de 625 μM d'HMSeBA va ser capaç de conferir protecció en el model d'estimulació amb H_2O_2 , es va procedir a determinar el possible efecte d'aquesta font davant l'estrès oxidatiu ocasionat per un estímul de més complexitat com és la inoculació del cultiu amb *Salmonella* Enteritidis. La presència del bacteri va incrementar la producció de ROS i la suplementació amb 625 μM HMSeBA en va contrarestar completament els efectes (Figura 36).

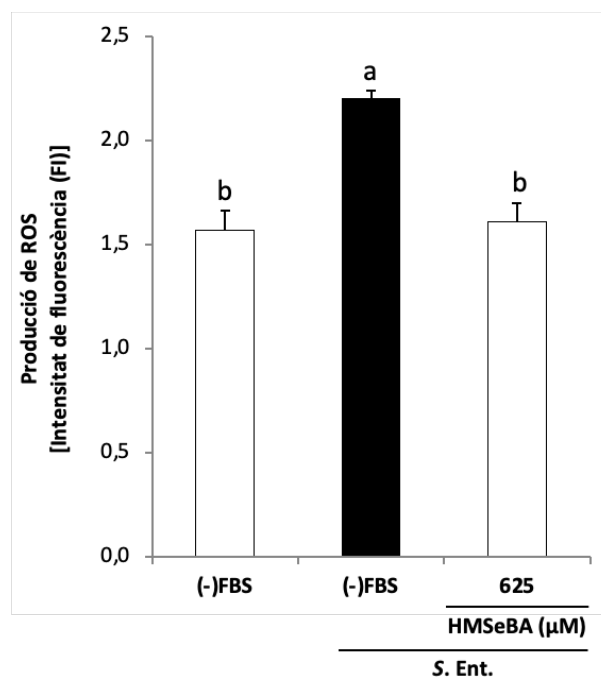


Figura 36. Producció de ROS en cèl·lules Caco-2 mantingudes en medi sense Se [(-)FBS] o en medi suplementat amb Se (625 μM HMSeBA) i estimulades amb *Salmonella* Enteritidis (*S. Ent*) (MOI 10) durant 3 h. Els resultats de producció de ROS es mostren com a intensitat de fluorescència (FI) obtinguda al final de l'experiment. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 9$ cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$).

4.1.5. Viabilitat de *Salmonella* Enteritidis

Per tal de descartar que l'efecte protector d'HMSeBA contra l'estrès oxidatiu produït per *Salmonella* Enteritidis fos degut a un efecte bactericida de la pròpia font, es va fer

un estudi de viabilitat de *Salmonella* Enteritidis en presència d'HMSeBA (en absència de cèl·lules Caco-2). Els resultats no van mostrar cap efecte sobre la viabilitat del bacteri en presència de 625 μ M HMSeBA (Figura 37).

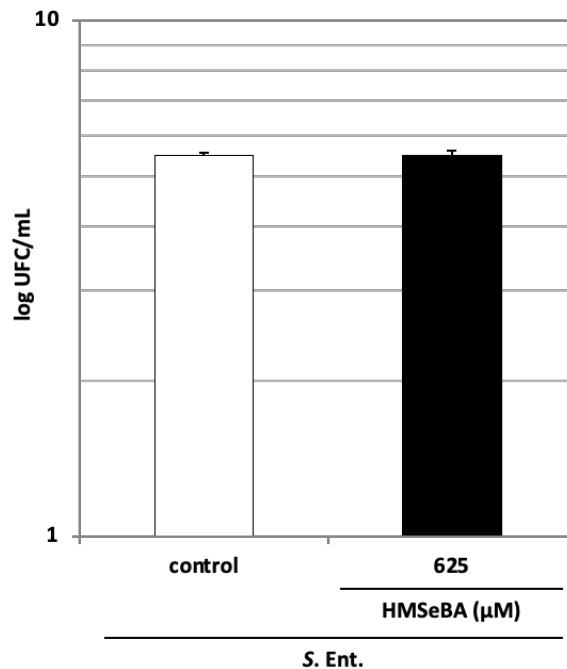


Figura 37. Nombre d'UFC de *Salmonella* Enteritidis (*S. Ent.*) en absència (control) o presència de 625 μ M HMSeBA. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 5$ experiments.

4.2. Estudi en macròfags derivats de monòcits THP-1

4.2.1. Model de privació de Se en macròfags

La segona part de l'estudi va consistir en determinar l'efecte de la privació de Se en macròfags sobre l'expressió de diverses selenoproteïnes. De la mateixa manera que amb l'estudi en cèl·lules Caco-2, es va determinar si la privació d'FBS podia tenir un efecte sobre la viabilitat del cultiu. Tant l'activitat LDH total del cultiu com l'activitat LDH relativa al medi de cultiu de la condició (-)FBS va mostrar valors menors que els obtinguts en la condició (+)FBS (Figura 38). Aquest resultat va suggerir que la privació d'FBS disminuïa el creixement cel·lular sense produir cap efecte citotòxic.

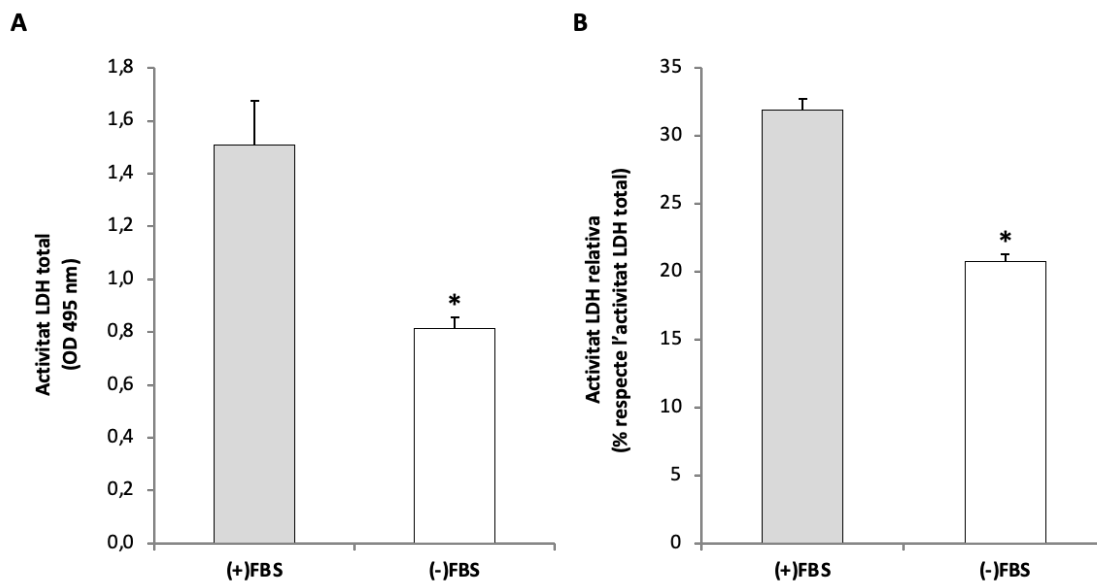


Figura 38. Activitat LDH en macròfags sembrats en medi control [(+)FBS] o en medi sense Se [(-)FBS]. (A) Activitat LDH total (activitat LDH al medi de cultiu + activitat LDH intracel·lular) i (B) activitat LDH relativa al medi de cultiu (expressada en % respecte l'activitat LDH total). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 12$ cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) respecte la condició (+)FBS.

A continuació, es va procedir a determinar l'efecte de la privació de Se en macròfags sobre l'expressió de diverses selenoproteïnes. La privació de Se va produir una disminució de l'activitat GPX només a les 24 h d'incubació (Figura 39A). Els resultats també mostren que l'expressió gènica de GPX1 va disminuir a les 6 i 24 h respecte a la condició (+)FBS (Figura 39B). Les dades també van mostrar una disminució de l'expressió al llarg del temps d'incubació. L'expressió proteica de SELENOP també va disminuir en el model de privació de Se, però només després de 24 h d'incubació (Figura 39C). Aquest efecte també va anar acompanyat d'una reducció de l'expressió gènica d'aquesta selenoproteïna (Figura 39D).

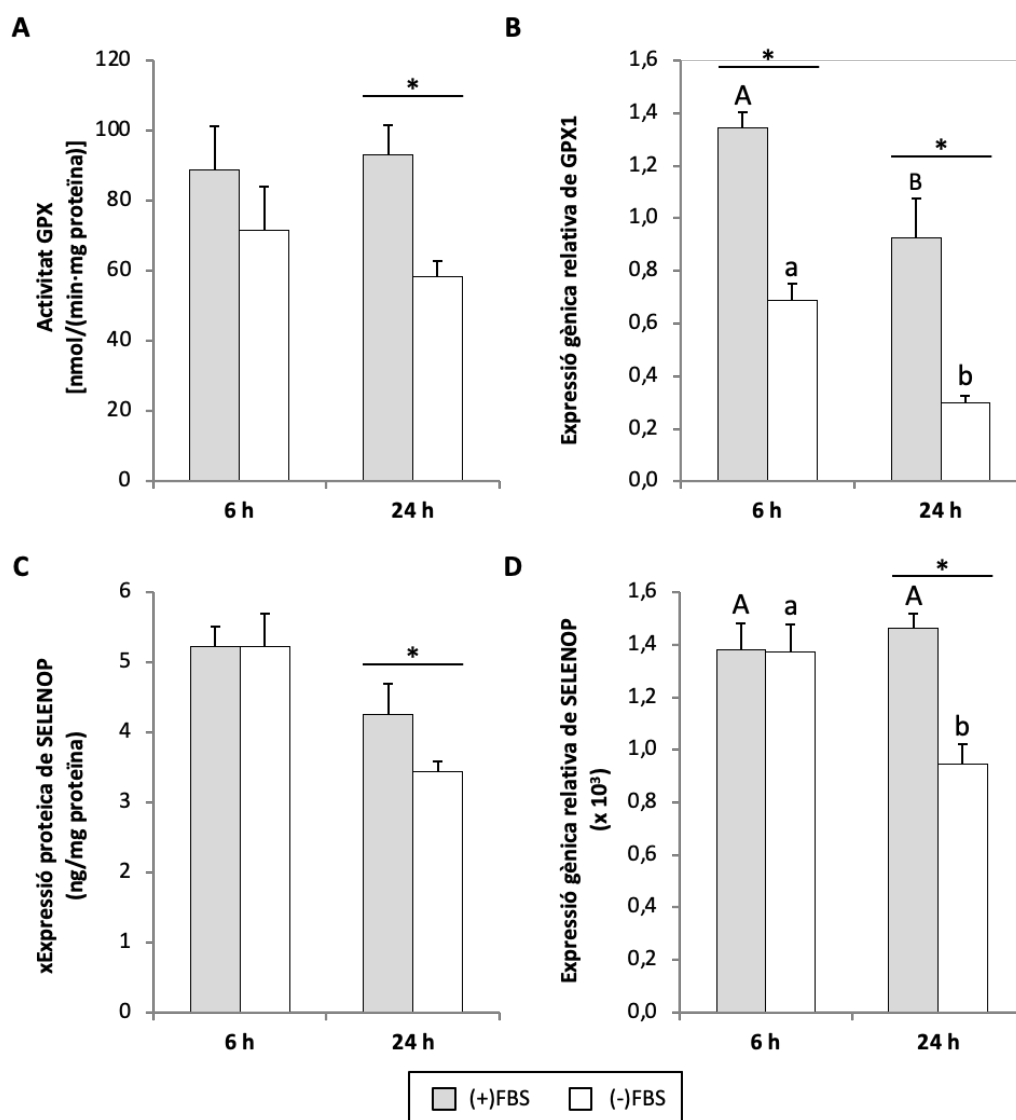


Figura 39. Activitat GPX (A), expressió gènica relativa de GPX1 (B), expressió proteica de SELENOP (C) i expressió gènica relativa de SELENOP (D) en macròfags sembrats en medi control [(+)FBS] o en medi sense Se [(-)FBS] durant 6 o 24 h. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta Ct}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 6$ cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre les condicions (+)FBS i (-)FBS. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre els diferents temps d'incubació.

A partir d'aquests resultats es pot determinar l'expressió relativa de les dues selenoproteïnes estudiades. L'anàlisi de les dades revela que l'expressió de GPX1 és molt major que la de SELENOP tant a les 6 h com a les 24 h (Figura 40).

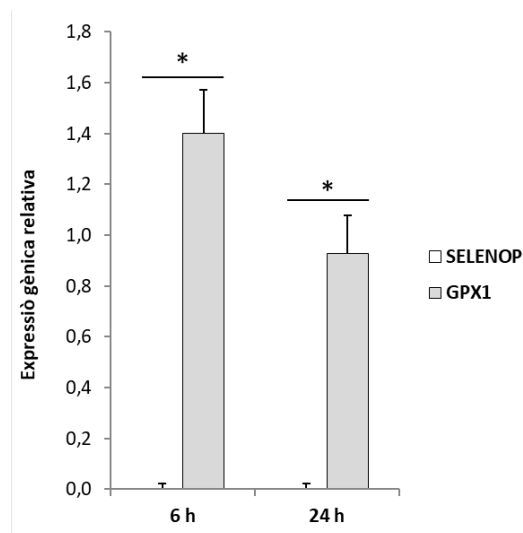


Figura 40. Expressió gènica relativa de SELENOP i GPX1 en macròfags sembrades en medi control [(+)FBS] durant 6 i 24 h. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta Ct}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 6$ cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre selenoproteïnes.

També es va determinar l'efecte de la privació de Se sobre la producció de ROS. Aquesta variable va incrementar després de 6 i 24 h d'incubació (Figura 41), assolint valors més elevats a les 24 h respecte a les 6 h.

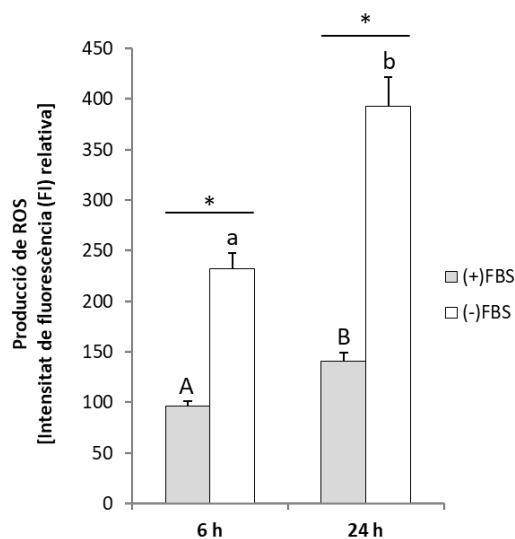


Figura 41. Producció de ROS en macròfags sembrats en medi control [(+)FBS] o en medi sense Se [(-)FBS] durant 6 o 24 h. Els resultats de producció de ROS es mostren com a intensitat de fluorescència (FI) relativa a l'obtinguda a l'inici de l'experiment $[(FI_f \times 100)/FI_i]$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 9$ cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre les condicions (+)FBS i (-)FBS. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre els diferents temps d'incubació.

4.2.2. Model de suplementació amb Se en macròfags

A partir d'aquest moment, l'estudi es va centrar en investigar l'efecte de l'HMSeBA sobre l'expressió gènica de les selenoproteïnes, ja que en cèl·lules Caco-2 es va observar que la característica diferencial de l'HMSeBA respecte al SS és la seva capacitat per modificar l'expressió gènica de les selenoproteïnes.

Prèviament, es va fer un estudi de citotoxicitat d'aquesta font. La suplementació dels macròfags amb l'HMSeBA no va modificar l'activitat LDH al medi de cultiu ni a la concentració de 12,5 ni a la de 625 μM [12,5 μM HMSeBA: $96,85 \pm 3,07$ % respecte (-)FBS; 625 μM HMSeBA: $93,21 \pm 1,71$ % respecte a (-)FBS; mitjana \pm error estàndard de $n = 6$ cultius, ($P > 0,05$)]. Es van utilitzar aquestes concentració d'HMSeBA perquè eren les que, en cèl·lules Caco-2, havien modificat l'expressió de selenoproteïnes.

En el model de suplementació amb Se, l'expressió gènica de GPX1 en macròfags suplementats amb 12,5 i 625 μM HMSeBA (Figura 42A) va incrementar respecte a la condició (-)FBS, arribant a assolir valors similars als obtinguts en macròfags mantinguts en medi control [(+)FBS]. En quant a l'expressió gènica de SELENOP (Figura 42B), la suplementació amb ambdues concentracions d'HMSeBA també va incrementar-ne l'expressió gènica respecte a la condició (-)FBS, assolint també valors similars als obtinguts en macròfags mantinguts en medi control [(+)FBS].

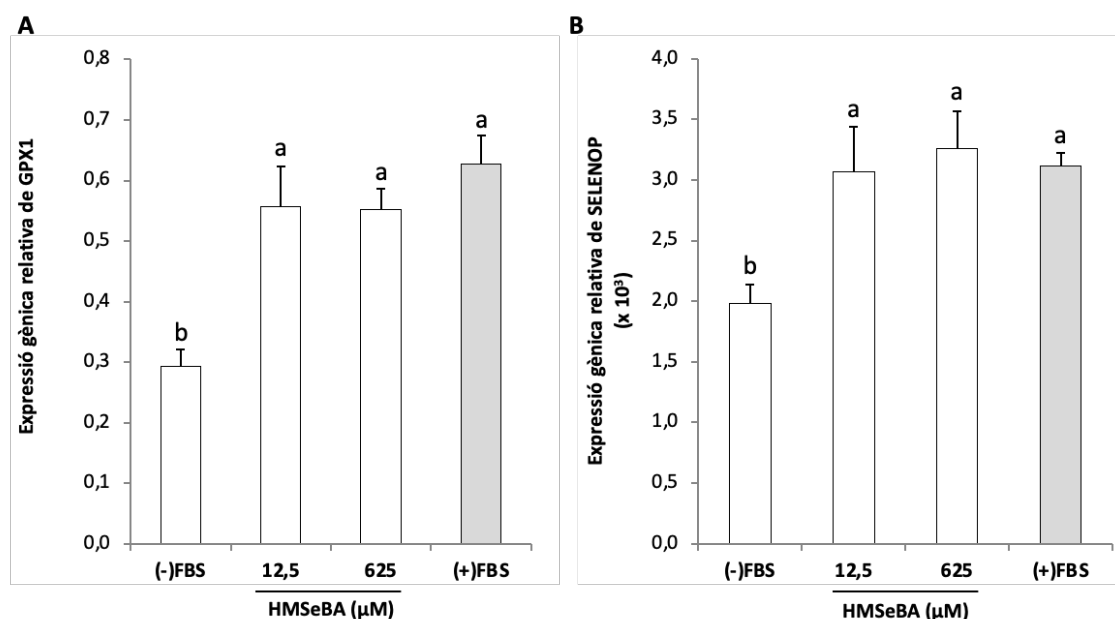


Figura 42. Expressió gènica relativa de GPX1 (A) i expressió gènica relativa de SELENOP (B) en macròfags mantinguts en medi sense Se [(-)FBS], en medi suplementat amb Se (12,5 i 625 μ M HMSeBA) o en medi control [(+)FBS]. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta Ct}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 6$ cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre les diferents condicions.

4.2.3. Model d'estimulació amb H_2O_2 en macròfags

Una vegada estudiat l'efecte de la suplementació amb HMSeBA, es va procedir a estudiar l'efecte protector d'aquesta font davant l'estrès oxidatiu, en el model d'estimulació amb H_2O_2 . L'estimulació dels macròfags (-)FBS amb H_2O_2 (1 mM) va incrementar la producció de ROS (Figura 43). La suplementació dels cultius amb 12,5 μ M HMSeBA va conferir una protecció parcial, mentre que la suplementació amb 625 μ M HMSeBA va contrarestar completament els efectes de l' H_2O_2 , arribant a assolir la producció de ROS de les cèl·lules no estimulades.

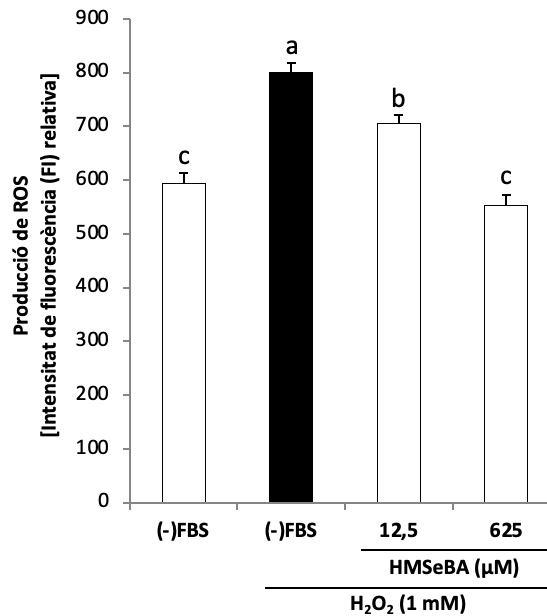


Figura 43. Producció de ROS en macròfags mantinguts en medi sense Se [(-)FBS] o en medi suplementat amb Se (12,5 i 625 μM HMSeBA) i estimulats amb H_2O_2 (1 mM). Els resultats de producció de ROS es mostren com a intensitat de fluorescència (FI) relativa a l'obtinguda a l'inici de l'experiment $[(\text{FI}_f \times 100)/\text{FI}_i]$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de $n = 9$ cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre les diferents condicions.

4.2.4. Model d'estimulació amb LPS en macròfags

Per tal de posar a punt el model, es va determinar l'efecte de l'LPS (100 i 250 ng/mL) sobre l'expressió gènica de GPX1 i la producció de ROS en macròfags estimulats durant 4 i 24 h. Els resultats van mostrar (Figura 44) que l'estimulació amb LPS disminueix l'expressió gènica de GPX1 tant a les 4 com a les 24 h, sense diferències entre ambdues concentracions d'LPS (Figura 44A i 44B). En canvi, la producció de ROS no va mostrar diferències en cap de les condicions assajades (Figura 44C i 44D). Per aquest motiu els efectes de l'estimulació també es van estudiar en presència d'FBS (Figura 45). En aquest cas, es va observar que l'expressió gènica de GPX1 disminueix a les 4 h, mentre que augmentava a les 24 h després de l'estimulació, sense observar diferències entre ambdues concentracions d'LPS (Figura 45A i 45B). Els resultats també van mostrar que, a diferència de la condició (-)FBS, la producció de ROS va

augmentar tant a les 4 com a les 24 h d'incubació amb l'LPS, de nou sense observar diferències entre ambdues concentracions d'LPS (Figura 45C i 45D).

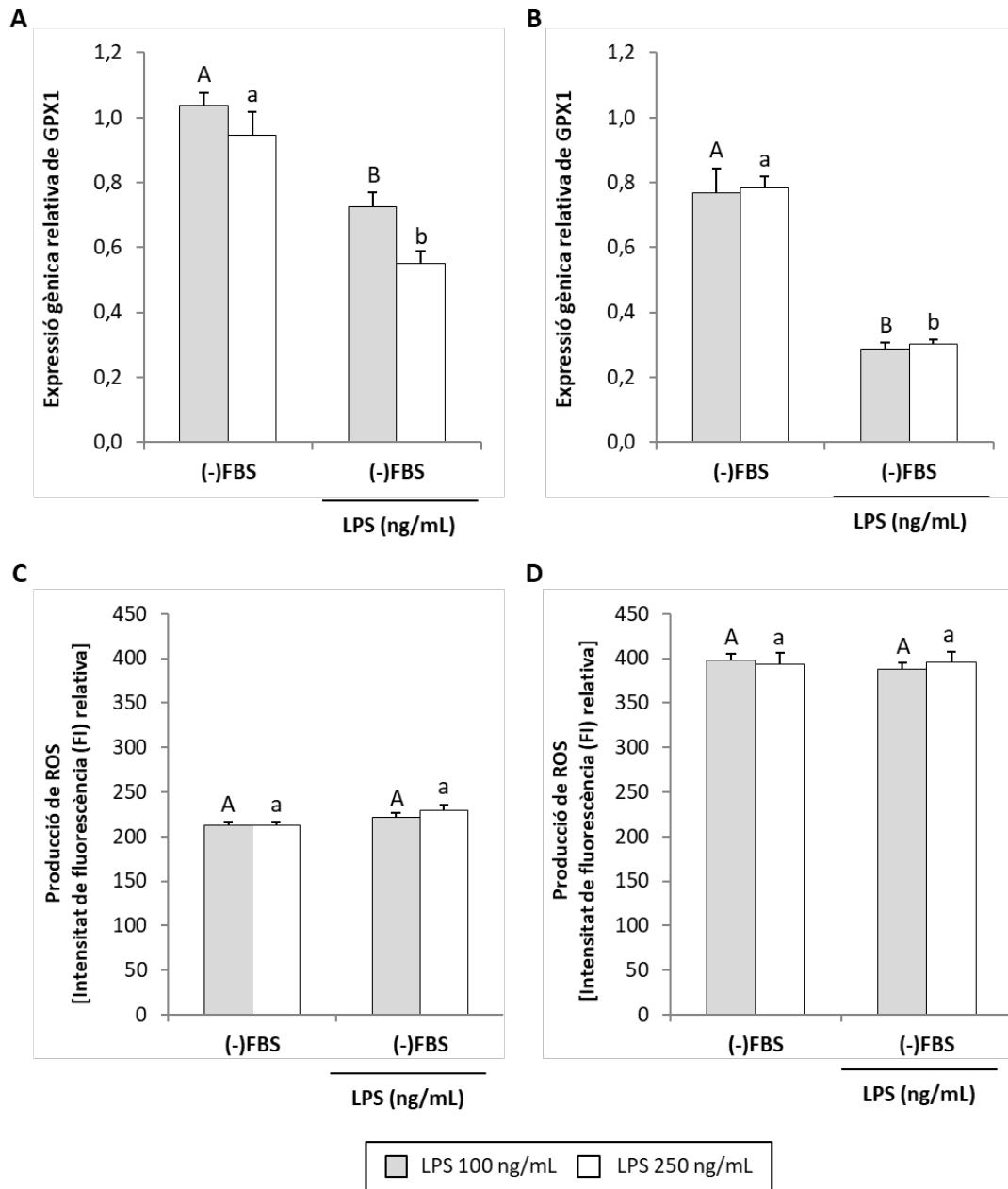


Figura 44. Expressió gènica relativa de GPX1 (A i B) (n = 6) i producció de ROS (C i D) (n = 9) en macròfags mantinguts en medi sense Se [(-)FBS] i estimulats amb LPS (100 i 250 ng/mL) durant 4 o 24 h (A i C, B i D respectivament). Els resultats de producció de ROS es mostren com a intensitat de fluorescència (FI) relativa a l'obtinguda a l'inici de l'experiment $[(FI_f \times 100)/FI_i]$. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta Ct}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre diferents condicions per a cada concentració d'LPS.

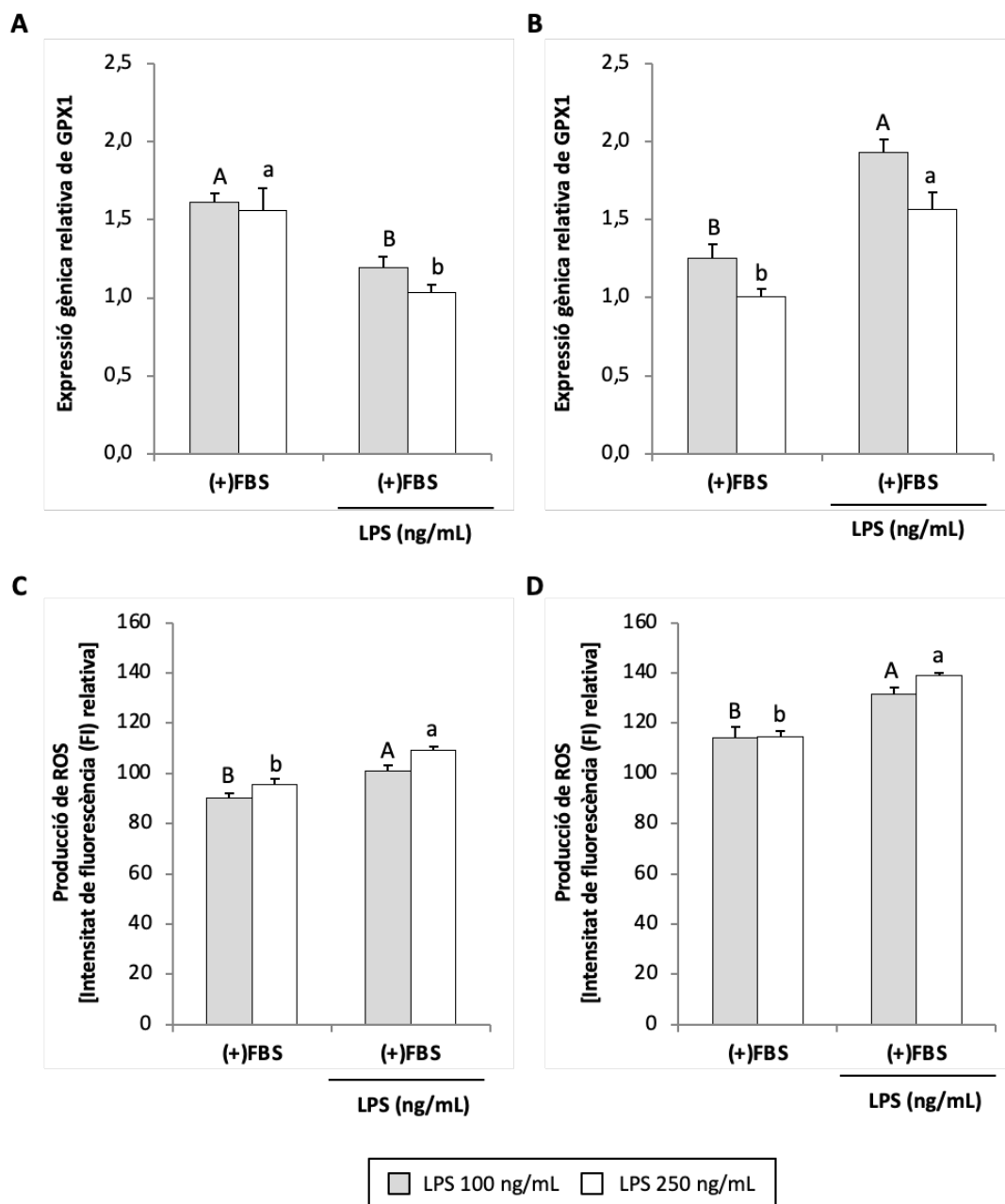


Figura 45. Expressió gènica relativa de GPX1 (A i B) (n = 6) i producció de ROS (C i D) (n = 9) en macròfags mantinguts en medi control [(+)FBS] i estimulats amb LPS (100 i 250 ng/mL) durant 4 o 24 h (A i C, B i D respectivament). Els resultats de producció de ROS es mostren com a intensitat de fluorescència (FI) relativa a l'obtinguda a l'inici de l'experiment $[(FI_f \times 100)/FI_i]$. Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta Ct}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre diferents condicions per a cada concentració d'LPS.

Tenint en compte, els resultats obtinguts, l'efecte de la suplementació amb HMSeBA en aquest model es va estudiar tant en absència com en presència d'FBS, comparant els resultats amb els obtinguts amb un antioxidant com és la NAC.

La suplementació amb HMSeBA va incrementar l'expressió gènica de GPX1 en totes les condicions assajades (Figura 46): a les 4 h es van arribar a assolir els valors obtinguts en cèl·lules no estimulades tant en la condició (-)FBS com (+)FBS; a les 24 h en la condició (-)FBS la suplementació va incrementar l'expressió gènica de GPX1 sense arribar, però, a assolir els valors de les cèl·lules no estimulades mentre que en la condició (+)FBS es van assolir valors per sobre dels de les cèl·lules no estimulades. En totes les condicions, la suplementació amb NAC no va induir cap efecte en aquesta variable, excepte en la condició (+)FBS a les 24 h, on es va observar un augment de l'expressió gènica.

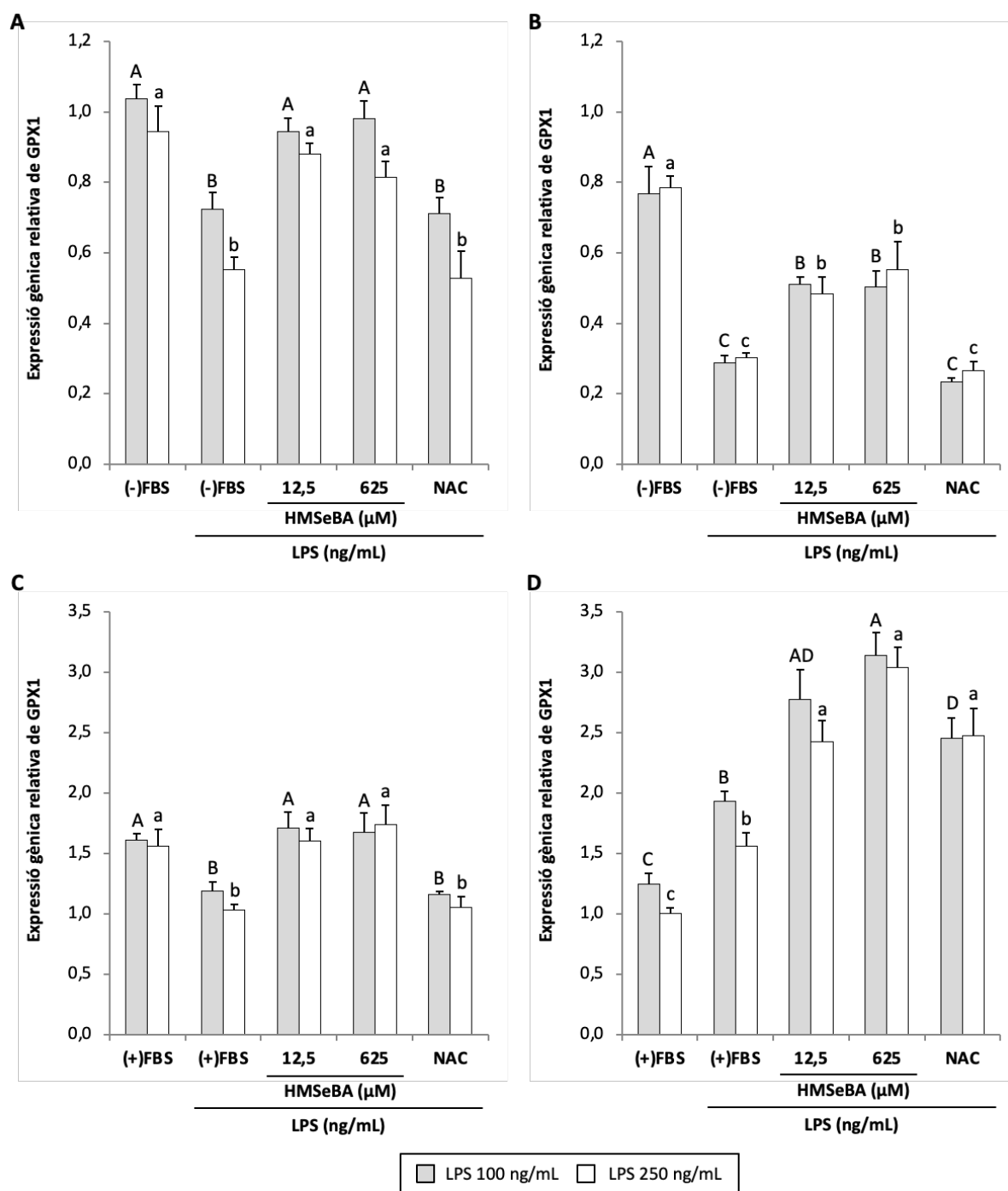


Figura 46. Expressió gènica relativa de GPX1 en macròfags mantinguts en medi sense Se [(-)FBS], en medi control [(+)FBS] (A i B, C i D, respectivament), en medi suplementat amb Se o NAC o en medi control suplementat amb Se o NAC (12,5 i 625 μM HMSeBA o 10 mM NAC) i estimulats amb LPS (100 i 250 ng/mL) durant 4 o 24 h (A i C, B i D, respectivament). Els resultats d'expressió gènica es calculen a partir de $2^{-\Delta Ct}$. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 6 cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives ($P < 0,05$) entre diferents condicions per a cada concentració d'LPS.

En el cas de la producció de ROS, la suplementació amb HMSeBA a la condició (-)FBS no va produir cap efecte excepte a les 24 h d'estimulació amb l'LPS, on l'HMSeBA 625 μ M en va reduir la producció (Figura 47A i 47B). En aquesta condició, la NAC va disminuir la producció de ROS, assolint valors més baixos amb la concentració més elevada d'LPS. A la condició (+)FBS (Figura 47C i 47D), tant la suplementació amb HMSeBA com amb NAC, va reduir la producció de ROS fins a assolir valors similars als de les cèl·lules no estimulades.

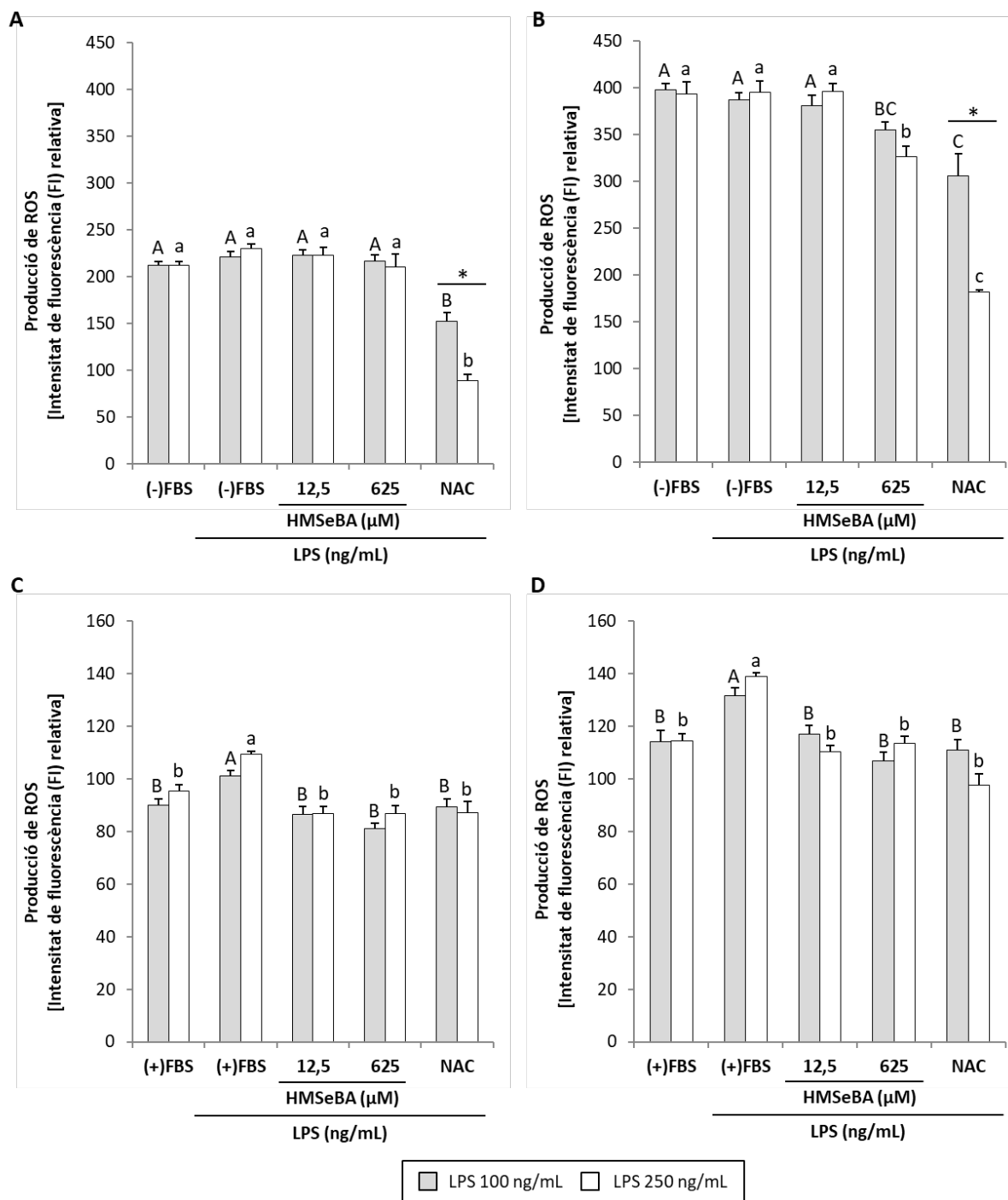


Figura 47. Producció de ROS en macròfags mantinguts en medi sense Se [(-)FBS], en medi control [(+)FBS] (A i B, C i D, respectivament), en medi suplementat amb Se o NAC o en medi control suplementat amb Se o NAC (12,5 i 625 μM HMSeBA o 10 mM NAC) i estimulats amb LPS (100 i 250 ng/mL) durant 4 o 24 h (A i C, B i D, respectivament). Els resultats de producció de ROS es mostren com a intensitat de fluorescència (FI) relativa a l'obtinguda a l'inici de l'experiment $[(FI_f \times 100)/FI_i]$. Els resultats s'expressen com a mitjana ± error estàndard de n = 9 cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives (P < 0,05) entre diferents condicions per a cada concentració d'LPS.

En aquests mateixos cultius i per confirmar els resultats obtinguts en referència a la producció de ROS, es va estudiar l'autofluorescència emesa pels macròfags com a indicador d'estrès oxidatiu a les 24 h després de l'estimulació amb 250 ng/mL d'LPS (Figura 48). A la condició (-)FBS no es van observar diferències en la intensitat de fluorescència emesa pels macròfags, ni pel que fa a l'estimulació amb l'LPS ni a la suplementació amb HMSeBA o NAC. En canvi, a la condició (+)FBS l'estimulació amb LPS va incrementar l'autofluorescència, mentre que la suplementació amb HMSeBA tant 12,5 com 625 μ M, la va reduir, assolint valors similars als de les cèl·lules no estimulades o inclús més baixos. La NAC també va disminuir l'autofluorescència fins assolir valors similars als de les cèl·lules no estimulades.

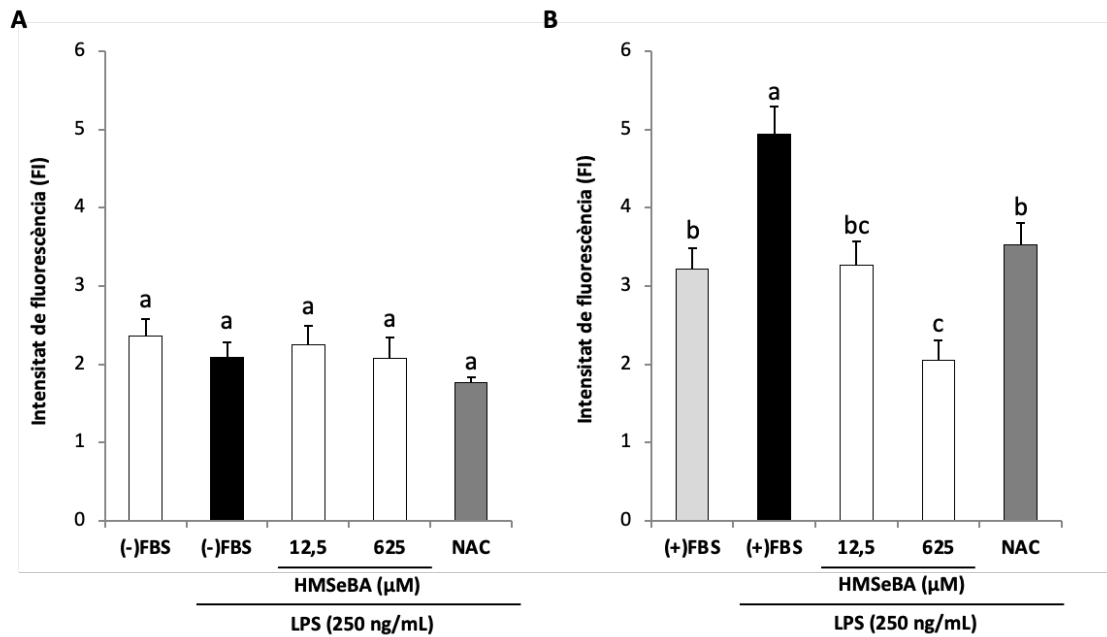


Figura 48. Autofluorescència en macròfags mantinguts en medi sense Se [(-)FBS] (A), en medi control [(+)FBS] (B), en medi suplementat amb Se o NAC o en medi control suplementat amb Se o NAC (12,5 i 625 μ M HMSeBA o 10 mM NAC) i estimulats amb LPS (250 ng/mL) durant 24 h. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 12 macròfags. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives (P < 0,05) entre diferents condicions.

L'estudi de l'efecte de l'HMSeBA sobre la producció de citocines es va realitzar tenint en compte els resultats anteriors, només amb la concentració més elevada d'LPS. En

les cèl·lules no estimulades (Taula 5), la producció de TNF α , IL-1 β i IL-10, tant en la condició (-)FBS com (+)FBS i després de 4 i 24 h, estava per sota del límit de detecció de la tècnica. En canvi, l'estimulació amb LPS va produir un augment de la producció de totes les citocines, assolint valors més elevats a la condició (+)FBS respecte a (-)FBS, excepte per IL-1 β a les 24 h.

Taula 5. Producció de citocines (TNF α , IL-1 β i IL-10) en macròfags mantinguts en medi sense Se [(-)FBS] o en medi control [(+)FBS] i estimulats amb LPS (250 ng/mL) durant 4 o 24 h. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 9 cultius. L'asterisc (*) denota diferències estadísticament significatives (P < 0,05) entre el grup (-)FBS i (+)FBS. ND: no detectable.

Temps	Citocina	(-)LPS		(+)LPS	
		(+/-)FBS	(-)FBS	(-)FBS	(+)FBS
4 h	TNF α	ND	2,18 \pm 0,159	15,21 \pm 0,838*	
	IL-1 β	ND	0,27 \pm 0,021	0,43 \pm 0,027*	
	IL-10	ND	0,02 \pm 0,002	0,31 \pm 0,023*	
24 h	TNF α	ND	7,02 \pm 0,564	13,08 \pm 0,742*	
	IL-1 β	ND	0,99 \pm 0,122	0,96 \pm 0,039	
	IL-10	ND	0,25 \pm 0,014	1,07 \pm 0,077*	

A la condició (-)FBS (Figura 49A i 49B), la producció de TNF α a les 4 i a les 24 h d'estimulació amb LPS no es va veure modificada amb la suplementació amb HMSeBA (12,5 μ M i 625 μ M), però si que va disminuir amb la NAC (10 mM). En presència d'FBS (Figura 49C i 49D), tant a 4 com a 24 h d'estimulació amb LPS, la suplementació amb 625 μ M HMSeBA va disminuir la seva producció. En quant a IL-1 β , en totes les condicions assajades, només la suplementació amb 625 μ M en va disminuir la seva producció, mentre que la NAC la va incrementar notòriament en la majoria de condicions (excepte a les 4 h en absència d'FBS). Respecte a IL-10, excepte a les 4 h d'estimulació amb LPS en absència d'FBS, la suplementació amb 625 μ M HMSeBA en va disminuir la producció. La suplementació amb NAC, però, va disminuir encara més la seva producció en comparació a l'HMSeBA.

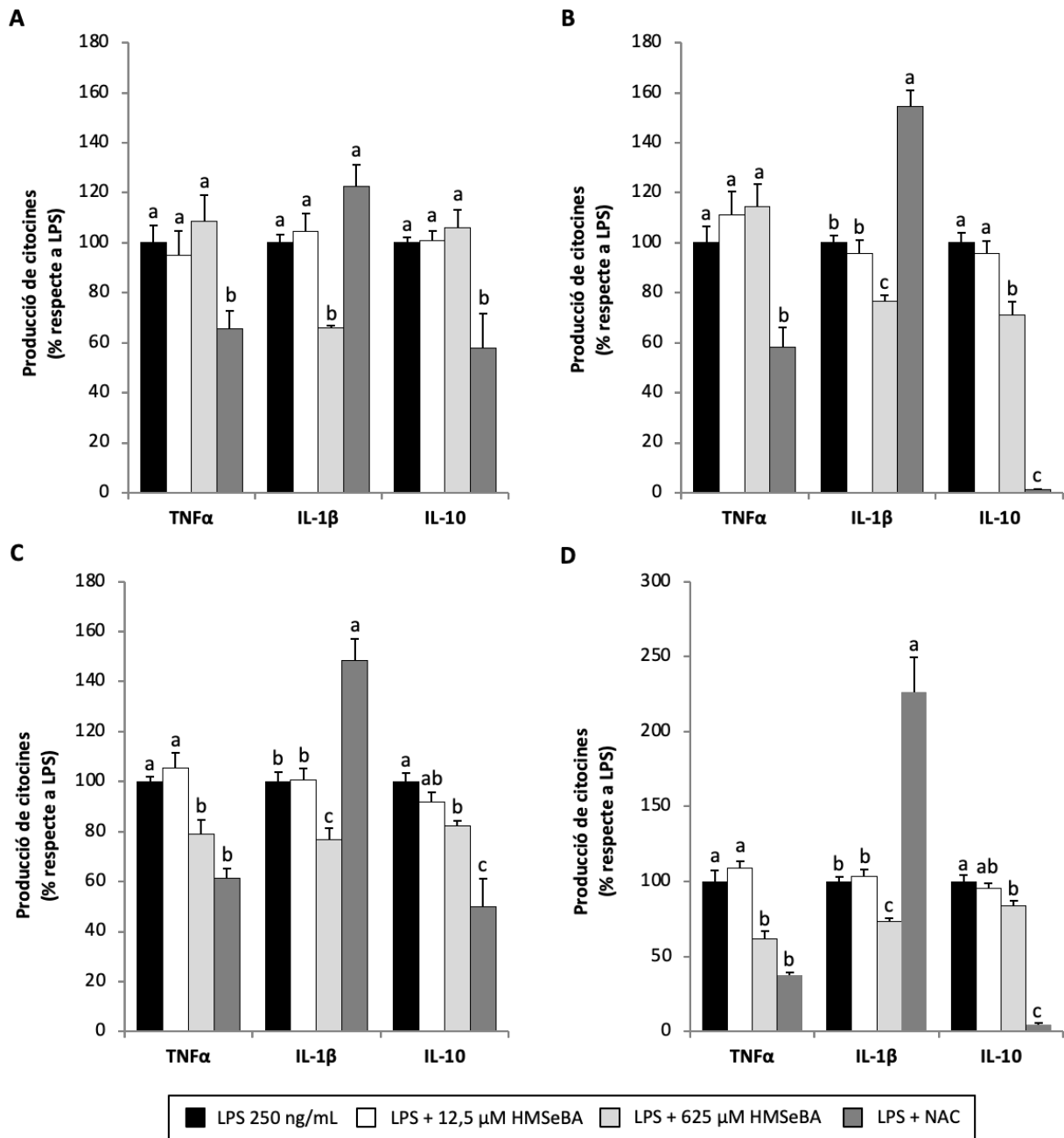


Figura 49. Producció de citocines (TNF α , IL-1 β i IL-10) en macròfags mantinguts en medi suplementat amb Se o NAC o en medi control suplementat amb Se o NAC (12,5 i 625 μ M HMSeBA o 10 mM NAC) (A i B, C i D, respectivament) i estimulats amb LPS (250 ng/mL) durant 4 o 24 h (A i C, B i D, respectivament). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 9 cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives (P < 0,05) entre diferents condicions per a cada citocina.

Finalment, es va estudiar l'efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre la capacitat fagocítica i bactericida dels macròfags estimulats amb LPS, però només en la condició

(+)FBS i utilitzant 625 μ M d'aquesta font (Figura 50). La reducció de les UFC de *Salmonella* Enteritidis del medi d'incubació després de l'estimulació amb LPS, fet que suggereix un augment de l'activitat fagocítica, es va veure accentuada amb la suplementació amb HMSeBA, mentre que la NAC no va exercir cap efecte (Figura 50A). De la mateixa manera, la reducció de les UFC de *Salmonella* Enteritidis del contingut intracel·lular després de l'estimulació amb LPS, fet que indica un augment de la capacitat bactericida, es va veure incrementada per la suplementació amb l'HMSeBA, així com també amb la NAC (Figura 50B).

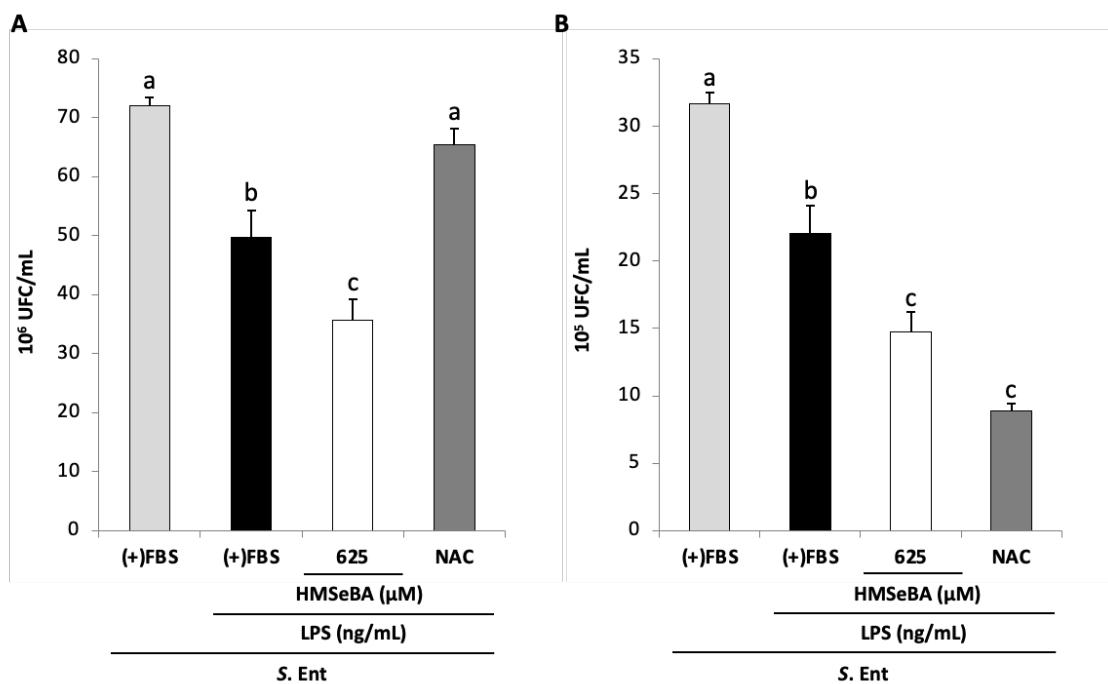


Figura 50. Recompte d'UFC extracel·lulars (A) i intracel·lulars (B) en macròfags mantinguts en medi control [(+)FBS] o en medi control suplementat amb Se o NAC (625 μ M HMSeBA o 10 mM NAC) i estimulats amb *Salmonella* Enteritidis (MOI 10) durant 3 h. Els resultats s'expressen com a mitjana \pm error estàndard de n = 6 cultius. Les lletres diferents denoten diferències estadísticament significatives (P < 0,05) entre diferents condicions.



5. DISCUSSIÓ

La incorporació de Se al pinso d'animals de granja és de gran importància per garantir un creixement òptim de l'animal, tant en termes productius com de salut i, per tant, de qualitat del producte (Briens et al., 2014; Surai et al., 2018). Atès que el Se és un element essencial per a l'expressió de les selenoproteïnes, la seva deficiència a la dieta és un factor de risc per diverses malalties cròniques associades a l'estrès oxidatiu i a una resposta immunitària inadequada (Schrauzer, 2003; Huang et al., 2012; Roman et al., 2014). Cal tenir en compte que a l'epiteli intestinal es genera un microambient prooxidant causat tant per substàncies provinents del medi extern així com per la resposta del seu propi sistema immunitari. En aquest sentit, l'activació dels macròfags residents al GALT produeix un increment de l'estrès oxidatiu. És per aquest motiu que aquestes cèl·lules també requereixen d'un sistema de defensa antioxidant adequat (Surai et al., 2019). S'ha observat que una ingesta adequada de Se contribueix no només al potencial antioxidant total del tracte gastrointestinal, sinó que també té un efecte antiinflamatori, antitumorigènic i de defensa contra patògens (Avery i Hoffmann, 2018), considerats fets claus en el manteniment de la salut intestinal. Tanmateix, és necessari considerar que una ingesta elevada de Se també pot produir efectes adversos (Combs, 2015), atès que el Se té un marge de seguretat molt estret (Surai, 2006).

El Se es pot utilitzar com a additiu en forma inorgànica, com l'SS, o en forma orgànica, com la Se-Met, el seu hidroxianàleg, o els llevats enriquits en Se. A la indústria avícola s'ha observat que les formes orgàniques presenten molts més avantatges respecte les formes inorgàniques en quant a l'absorció, l'acumulació en teixits, l'efecte antioxidant i inclús en quant a la contaminació ambiental (Yamei Chao, 2019). De totes maneres, la producció de fonts orgàniques també implica processos de producció més complexos i costosos (Yamei Chao, 2019). Així doncs, ampliar el coneixement sobre les fonts orgàniques és, actualment, un tema d'interès. Aquesta tesi es centra en l'estudi del paper de l'HMS₂SeBA, l'hidroxianàleg de la Se-Met, com a font orgànica de Se en cultius de cèl·lules intestinals Caco-2 i de macròfags. Tenint en compte que l'FBS del medi de cultiu conté Se-Met, va ser necessari posar a punt un model de privació de

Se que permetés estudiar l'efecte de suplementació amb HMSeBA. Aquest model de privació de Se s'ha dissenyat a partir del descrit en cèl·lules Caco-2 (Zeng et al., 2008; Speckmann et al., 2014) i en macròfags (Vunta et al., 2008).

La reducció de l'activitat GPX és una característica comuna dels models cel·lulars de privació de Se induïts per l'eliminació de l'FBS del medi de cultiu tant en cèl·lules Caco-2 (Wingler et al., 2000; Zeng et al., 2008; De Spirt et al., 2016) com en macròfags (Prabhu et al., 2002; Vunta et al., 2007 i 2008). En ratolins, també s'ha observat que l'activitat GPX al còlon disminueix quan aquests són alimentats amb una dieta pobre en Se (Kipp et al., 2009). En el cas dels macròfags, els resultats obtinguts en el model de privació de Se mostren una disminució de l'activitat GPX i així com de l'expressió gènica de GPX1, la selenoproteïna majoritària en aquestes cèl·lules (Carlson et al., 2009). A l'epiteli intestinal, cal tenir en compte, però, que la regulació de la síntesi de les diverses isoformes de GPX és un procés complex (Banning et al., 2005). De fet, mentre que la isoforma GPX1 respon a la privació de Se amb una disminució de la seva expressió proteica i activitat així com amb una menor quantitat d'mRNA, la isoforma GPX2 manté la seva expressió gènica o inclús l'incrementa (Speckman et al., 2011; Barrera et al., 2012; Maciel-Dominguez et al., 2013). Aquests resultats concorden amb els obtinguts en el model de privació de Se establert en cèl·lules Caco-2. En aquest sentit, s'ha descrit que l'mRNA de GPX2 incrementa la seva expressió en absència de Se, per tal de ser sintetitzat ràpidament de nou quan el Se torni a estar disponible (Wingler et al., 2000). S'ha descrit que l'increment de l'expressió gènica de GPX2, així com també la de TXNRD, respon a una activació del factor de transcripció Nrf2 (De Spirt et al., 2016) causada per l'estrès oxidatiu generat per la deficiència de Se. En aquest sentit, els nostres resultats confirmen l'increment de la producció de ROS en absència de Se, tal i com s'havia descrit prèviament (Carlson et al., 2009; Xu et al., 2020). El fet que l'activitat TXNRD no s'hagi vist alterada en el model de privació de Se, podria ser degut a un increment de l'expressió gènica de TXNRD1. També s'ha descrit la possibilitat que, en absència de Se, es produeixi una menor degradació de l'mRNA tant de GPX2 com de TXNRD1 (Wingler et al., 2001; Seyedali i Berry, 2014).

Aquesta regulació de l'expressió gènica haurà d'anar acompanyada de la degradació d'altres selenoproteïnes menys crucials, per tal d'assegurar la disponibilitat de Se.

En el model de privació de Se en cèl·lules Caco-2, es va observar una reducció de l'expressió proteica de SELENOP. No hi ha gaire bibliografia al respecte, però Speckmann et al. (2011) van observar una disminució de la secreció de SELENOP al compartiment basolateral en cèl·lules Caco-2 privades de Se. De la mateixa manera, els resultats obtinguts en el model de privació de Se en macròfags també mostren una disminució de l'expressió tant proteica com gènica de SELENOP, la segona selenoproteïna més expressada en aquestes cèl·lules (Carlson et al., 2009).

A més, els resultats obtinguts en ambdós models mostren que tant l'activitat GPX com l'expressió proteica de SELENOP estan relacionades amb la seva expressió gènica, suggerint que l'expressió d'aquestes selenoproteïnes està regulada a nivell transcripcional. De totes maneres, no es pot descartar una regulació a nivell de traducció, ja que Schoenmakers et al. (2016) van constatar que en un medi deficient en Se, l'expressió de selenoproteïnes altament relacionades amb l'estrès oxidatiu disminueix degut a la reducció de l'expressió d'una isoforma específica del tRNA^{[Ser]Sec} (mcm⁵Um).

Un cop establert el model de privació de Se en ambdues línies cel·lulars i considerant la toxicitat descrita per aquest element a la bibliografia (Turner i Finch, 1991; Dumont et al., 2006; Mangiapane et al., 2014), es va estudiar el possible efecte citotòxic de l'HMSeBA en els cultius. Aquesta font orgànica no va mostrar citotoxicitat en cap de les concentracions utilitzades, mentre que en cèl·lules Caco-2, l'SS va mostrar una marcada citotoxicitat a partir de 12,5 µM. Barrera et al. (2012) i Takahashi et al. (2017) també van trobar que aquesta font inorgànica produïa citotoxicitat a concentracions baixes. Per aquesta raó, l'SS es va utilitzar a una concentració de 5 µM en els experiments posteriors en cèl·lules Caco-2, mentre que el rang de concentracions d'HMSeBA utilitzat va ser molt més ampli (12,5 µM – 625 µM). Per

tant, els resultats obtinguts confirmen que les fonts orgàniques (HMSeBA i Se-Met) mostren una menor toxicitat que les fonts inorgàniques (SS), tal i com s'ha descrit prèviament (Alimohamady et al., 2013; Stoffaneller i Morse, 2015; Li et al., 2021). La utilització d'elevades concentracions d'HMSeBA està justificat si es considera que aquesta font s'ha de metabolitzar prèviament a Se-Met per poder ser utilitzada per la síntesi de selenoproteïnes. De fet, s'ha descrit que l'HMSeBA és completament convertit a Se-Met i a Sec i que és capaç d'incrementar la deposició de Se en plasma, fetge i múscul de pollastres (Briens et al., 2014), així com també en ous i múscul de gallines ponedores (Jlali et al., 2013). Per tant, tot i que el metabolisme és complet en diferents teixits, cal considerar que la conversió pot ser un factor limitant en un model de cultius cel·lulars. En el cas dels macròfags, la suplementació amb HMSeBA tampoc ha induït citotoxicitat, tal i com han descrit per altres fonts orgàniques Wang et al. (2020) i Zhuang et al. (2020).

Els resultats obtinguts demostren que la suplementació de les cèl·lules Caco-2 amb l'HMSeBA és capaç d'incrementar l'activitat GPX, tal i com també ho fan la Se-Met i l'SS. En aquest sentit, Wang i Fu (2012) van obtenir valors similars d'activitat GPX tant amb la suplementació amb SS com amb Se-Met. Per tant, es pot suggerir que l'activitat GPX no es veuria afectada per la font de Se utilitzada. La suplementació amb HMSeBA i Se-Met, va ser capaç d'incrementar l'expressió gènica tant de GPX1 com de GPX2 en cèl·lules Caco-2. En canvi, l'SS no la va modificar, posant de manifest una diferència important entre l'efecte de les fonts orgàniques i inorgàniques. En aquest sentit, s'ha descrit que les formes orgàniques com la Se-Met tenen una major capacitat per induir l'expressió de diversos mRNA de diferents isoformes de GPX que no pas l'SS, tant en còlon de rata (Maseko et al., 2014) com en teixit cerebral de ratolí (Song et al., 2014). En el cas de l'HMSeBA, també s'ha descrit un augment de l'expressió GPX3 i GPX4 en el fetge, múscul i plasma de pollastres (Zhao et al., 2017). Per tant, el fet que aquesta font de Se també augmenti l'expressió gènica de les isoformes GPX1 i GPX2 en cèl·lules Caco-2 és d'especial importància. Més recentment, també s'ha descrit que l'HMSeBA incrementa l'expressió gènica de GPX1, GPX2 i GPX3 en diferents segments de l'intestí

de porc (Li et al., 2021), confirmant així la capacitat d'aquesta font per modular l'expressió gènica. De la mateixa manera, la suplementació amb HMSeBA també va ser capaç d'incrementar l'expressió gènica de GPX1 en macròfags, resultats que descriuen per primer cop la seva capacitat per modular l'expressió gènica en una cèl·lula del sistema immunitari. En aquest sentit, Dhanjal et al. (2017) van observar un increment en l'expressió gènica de GPX1 en macròfags murins (RAW264.7) suplementats amb una font orgànica de Se extreta del blat. Diversos estudis relacionen una disminució en l'expressió de les diferents isoformes de GPX a l'intestí, principalment GPX1 i GPX2, amb processos inflamatoris com la colitis o amb un increment de la tumorigènesi (Esworthy et al., 2011; Li et al., 2021). A més, s'ha demostrat en macròfags, que un increment de l'expressió de selenoproteïnes com la GPX1 disminueix l'expressió de la ciclooxigenasa-2 i la síntesi de prostaglandines derivades de l'àcid araquidònic (Dhanjal et al., 2017), així com també la formació d'òxid nítric, posant de relleu la relació entre el Se i el control dels processos inflamatoris. Per tant, el fet que l'HMSeBA incrementi l'expressió gènica d'aquesta selenoproteïna en ambdós models cel·lulars posa de relleu la importància d'aquesta font de Se en la protecció de la salut intestinal.

En cèl·lules Caco-2, l'HMSeBA també és capaç d'incrementar l'activitat TXNRD. De Spirt et al. (2016) també van observar un increment de l'activitat TXNRD quan suplementaven cèl·lules Caco-2 amb SS, suggerint de nou que l'activitat d'aquest enzim augmenta tant amb fonts orgàniques com inorgàniques. Tot i que en aquest estudi no s'ha determinat l'efecte de la suplementació sobre l'expressió gènica de les diferents isoformes de TXNRD, estudis previs posen de relleu que ni l'expressió gènica de TXNRD1 ni de TXNRD2 (Hu et al., 2010; Barrera et al., 2012; Kipp et al., 2012; Maseko et al., 2014), ni la seva expressió proteica (Kipp et al., 2012; De Spirt et al., 2016) es veuen afectades per la suplementació amb Se, independentment que s'utilitzin fonts orgàniques o inorgàniques.

Els nostres resultats en cèl·lules Caco-2 mostren que per induir l'expressió proteica de SELENOP calen concentracions més altes d'HMSeBA que no pas d'SS. En aquest

sentit, s'ha descrit que en cèl·lules hepàtiques HepG2, tant l'SS com la Se-Met poden induir l'expressió proteica de SELENOP, tot i que els resultats obtinguts amb la font inorgànica son quatre vegades més grans que els obtinguts amb la font orgànica (Hoefig et al., 2011). De totes maneres, només l'HMSeBA és capaç de preparar la cèl·lula incrementant també l'expressió gènica de SELENOP. De fet, en múscul i fetge de pollastres s'ha observat una major capacitat de l'HMSeBA que no pas de l'SS per incrementar l'expressió gènica de SELENOP (Zhao et al., 2017). De la mateixa manera, Yuan et al. (2013) van determinar que l'mRNA de SELENOP incrementa si s'utilitza una font orgànica, mentre que no varia si s'utilitza SS. La funció principal de SELENOP és el transport de Se a d'altres teixits. Cal posar de relleu el fet que l'HMSeBA sigui capaç d'incrementar l'expressió d'aquesta selenoproteïna a l'intestí, tal i com descriu Li et al. (2021), permetent així una major mobilització de Se, així com una deposició de Se més eficient en d'altres teixits. També cal tenir en compte la funció antioxidant de SELENOP que s'ha relacionat amb una disminució de l'estrès oxidatiu a l'intestí i amb una menor incidència de malaltia inflamatòria intestinal i càncer colorectal (Kudva et al., 2015; Short et al., 2018), posant de nou en relleu el paper que pot tenir l'HMSeBA en l'homeòstasi intestinal. En quant a les discrepàncies trobades en cèl·lules Caco-2 entre l'expressió proteica i gènica de SELENOP, Bermano et al. (1995) van determinar que el Se regula de manera diferent l'activitat dels selenoenzims respecte a l'abundància del seu mRNA. De fet, l'expressió de les selenoproteïnes està regulada tant a nivell de traducció com a nivell de l'estabilitat de l'mRNA (Kipp et al., 2009) degut a la regulació per part de seqüències d'mRNA i/o de proteïnes d'unió a l'mRNA (Müller et al., 2003).

Pel que fa a l'expressió de SELENOP en macròfags, s'ha descrit que durant el canvi fenotípic de macròfags M1 a M2 es produeix un increment de l'expressió de SELENOP (Bosschaerts et al., 2008), posant de relleu la importància del paper d'aquesta selenoproteïna en la resolució de la inflamació. També s'ha observat que una disminució de l'expressió de SELENOP està relacionada amb un augment en la producció de citocines proinflamatòries (Short et al., 2018; Ding et al., 2021). En

aquest sentit, Barrett et al. (2017) han constatat que l'increment en l'expressió de SELENOP en macròfags proinflamatoris condicionats amb medi provinent de cèl·lules tumorals, té un paper antiinflamatori molt important.

Un increment en l'expressió gènica de les diferents selenoproteïnes causat per la suplementació amb HMSeBA podria mantenir les defenses antioxidants i ajudaria a l'epiteli intestinal a adaptar-se i superar l'estrès oxidatiu amb unes conseqüències negatives mínimes. Estudis previs han demostrat que les fonts de Se orgàniques confereixen un millor efecte protector contra diverses condicions d'estrès oxidatiu que no pas les fonts inorgàniques (Bansal i Kaur, 2002; Sahin et al., 2008; Barrera et al., 2012; Song et al., 2014; Sun et al., 2020). Aquest increment en l'expressió, explicaria els efectes positius d'aquesta font orgànica per contrarestar l'increment de ROS produït per H₂O₂ i *Salmonella* Enteritidis. Cal destacar que, un increment en la producció de ROS, desencadena la producció de productes d'oxidació secundària. La formació de radicals lliures poden produir canvis estructurals en les proteïnes, com per exemple la formació de carbonilacions proteiques. Aquestes proteïnes modificades son degradades ràpidament, però una producció excessiva de ROS pot produir l'acumulació d'aquest tipus de proteïnes (Randjelovic et al., 2008). Un excés en la producció de ROS també pot desencadenar l'oxidació de lípids, generant tot una sèries de productes altament perillosos. Així, el 4-HNE, un dels principals indicadors de la peroxidació lipídica, es considera un producte altament tòxic (Ayala et al., 2014). Cal remarcar que ambdós productes d'oxidació generen al seu torn un major estrès oxidatiu i també estan relacionats amb l'activació de processos inflamatoris (Ayala et al., 2014). En ambdós casos, tant en l'oxidació proteica com en la peroxidació lipídica, l'HMSeBA ha sigut capaç de reduir-ne la seva formació quan les cèl·lules Caco-2 han estat incubades en presència d'H₂O₂. Cal fer esment que a l'epiteli intestinal l'estrès oxidatiu trenca la funció epitelial de barrera i l'HMSeBA hi podria tenir un paper important en la protecció. En aquest sentit, Brufau et al. (2016) van observar que la producció de ROS induïda per *Salmonella* Enteritidis trenca la funció epitelial de barrera a través de canvis en la localització de les proteïnes de la unió estreta.

En el cas dels macròfags, el fet que l'HMSeBA incrementi l'expressió gènica de GPX1 i SELENOP i disminueixi la producció de ROS en presència d'H₂O₂ garantiria unes defenses antioxidants pròpies i així superar l'estrès oxidatiu amb les mínimes conseqüències negatives. Per comprovar el paper de l'HMSeBA sobre la resposta immunitària, es va estudiar el seu efecte en macròfags estimulats amb LPS. Es va observar però, que l'absència d'FBS afecta l'activació dels macròfags, ja que la producció de ROS no es veu modificada en aquesta condició. Per aquesta raó, l'efecte de la suplementació amb HMSeBA també es va estudiar en presència d'FBS, que conté petites quantitats de Se-Met. En aquest sentit, s'ha de tenir en compte que les dietes base d'animals de granja també contenen petites quantitats de Se-Met provinent dels cereals (Fisinin et al., 2009).

Tant en presència com en absència d'FBS, l'LPS va disminuir significativament l'expressió gènica de GPX1, tal i com ja havien observat Carlson et al. (2009) i Wang et al. (2018). De totes maneres, el patró d'expressió gènica de GPX1 canvia en presència d'FBS ja que a les 24 h d'estimulació es produeix un increment de l'expressió de GPX1. Wang et al. (2018) van observar que en cèl·lules RAW264.7 estimulades amb LPS incrementa l'expressió de certes selenoproteïnes com TXNRD a partir de les 24 h, fet que expliquen com un mecanisme per contrarestar els efectes de l'LPS en períodes d'incubació llargs. Pel que fa a la suplementació, l'increment en l'expressió de GPX1 induït per l'HMSeBA denota la capacitat que té aquesta font orgànica per donar suport a l'expressió d'aquesta selenoproteïna inclús en condicions no fisiològiques. En quant a l'efecte de la NAC, la reducció de ROS que produeix aquest antioxidant no va acompanyada d'un increment en l'expressió gènica de GPX1 en cap de les condicions testades, excepte a les 24 h d'estimulació amb LPS en presència d'FBS. En aquest sentit, i d'acord amb els nostres resultats a temps d'incubació llargs, Krifka et al. (2012) van constatar que la suplementació amb NAC de cèl·lules RAW264.7 exposades a HEMA (un potent prooxidant) durant períodes llargs produeix un augment en l'expressió de GPX1 i GPX2. En aquest cas, aquests autors atribueixen aquest increment a l'elevada producció de ROS acompanyada de l'increment en la

concentració de GSH, substrat d'aquestes selenoproteïnes, que és sintetitzat a partir de la NAC.

En quant a l'estrès oxidatiu i la producció de citocines en macròfags, els resultats obtinguts varien segons si l'FBS està present o no al cultiu: en presència d'FBS, l'LPS és capaç d'induir la producció de ROS, TNF α , IL-1 β i IL-10, així com també un increment de l'autofluorescència; en absència d'FBS, l'LPS no exerceix cap canvi ni en la producció de ROS ni en l'autofluorescència i la producció de citocines és menor que en presència d'FBS. De manera similar, Palacio et al. (2011) van constatar que en absència d'FBS, l'LPS no és capaç d'induir la producció de ROS en macròfags THP-1. De totes maneres, i d'acord amb els nostres resultats, quan incuben aquestes cèl·lules amb LPS junt amb NAC, si que observen una disminució de la producció de ROS. Safir et al. (2003) també van observar una menor producció de citocines en macròfags J774.1 mantinguts en absència d'FBS i atribueixen aquest fet a un pèrdua d'immunocompetència de les cèl·lules o a una disminució de l'expressió d'enzims proteolítics necessaris per l'alliberació de les citocines, com el TNF α , a partir dels seus precursors. Aquests resultats també podrien ser atribuïts a la manca de la proteïna d'unió a l'LPS (present normalment a l'FBS), necessària per tal que l'LPS pugui unir-se eficientment al seu receptor (Toll-like receptor 4; TLR4) (Gerberick et al., 1985; Jian et al., 1995). En absència d'aquesta proteïna es produiria una menor activació dels macròfags i la subseqüent disminució en la producció citocines, sense que la producció de ROS es vegi modificada. De totes maneres, cal destacar que encara que no es veu modificada per les diferents condicions, la producció de ROS en absència d'FBS és molt elevada. Tanmateix, es desconeix el mecanisme implicat ja que no va acompanyat ni d'un increment de l'autofluorescència ni de la producció de citocines i, per tant, no estaria associat a una activació del macròfag per LPS. En canvi, en presència d'FBS, l'LPS activaria eficientment les vies NF- κ B i MAPK, produint canvis en l'estat redox de la cèl·lula i incrementant la producció de citocines (Guha i Mackman, 2001; Brufau et al., 2017). A més, Verstovsek et al. (1994) van observar un increment en l'autofluorescència de macròfags provinents de la melsa estimulats amb

LPS. En aquest sentit, Sköld et al. (1989) i Pankow et al. (1995) van observar una major autofluorescència en macròfags alveolars degut a la presència de grans quantitats de ROS, així com també una major activitat metabòlica. Edelson et al. (1985) també van constatar que la formació d'adductes de proteïnes induïx un increment en l'autofluorescència. A més, hi ha diversos estudis que relacionen l'autofluorescència emesa pels macròfags amb la seva activació (Njoroge et al., 2001) o amb la producció de citocines com IL-1 α (Wolfram et al., 2021).

Un substrat amb provada capacitat antioxidant com la NAC no només va ser capaç de reduir la producció de ROS, sinó també la producció de TNF α i IL-10 en tots els casos estudiats. En canvi, va incrementar de manera molt notòria la producció d'IL-1 β . En aquest mateix sentit, Parmentier et al. (2000) i Ryan et al. (2004) van observar en macròfags derivats de THP-1 que la NAC és capaç tant de disminuir la producció d'IL-8 i ROS mediada per LPS com la translocació d'NF- κ B cap al nucli, disminuint així l'expressió de citocines. Contràriament, s'ha observat un increment d'IL-1 β en totes les condicions en afegir NAC a les cèl·lules. Resultats similars van ser obtinguts per Parmentier et al. (2000) quan s'utilitzaven altes concentracions de NAC (5 mM – 10 mM) en la mateixa línia cel·lular.

La suplementació amb HMSeBA va reduir la producció de ROS, el pic d'autofluorescència i la producció de totes les citocines com a conseqüència de l'estimulació amb LPS. En aquest sentit, les cèl·lules deficientes de Se mostren una elevada activació del complex NF- κ B, acompanyada d'una major expressió de no només citocines proinflamàtores, sinó també de citocines antiinflamàtores (Kim et al., 2004; Xu et al., 2020). De la mateixa manera, s'ha observat que el Se redueix la producció de citocines proinflamàtores degut a la inhibició del complex NF- κ B (Zhang et al., 2014; Surai et al., 2021). Nelson et al. (2011) constataren que la suplementació amb Se és capaç d'induir la polarització de macròfags de la medul·la espinal d'M1 cap a M2. Diversos estudis confirmen que la suplementació amb HMSeBA en condicions fisiològiques és capaç de disminuir la producció de citocines proinflamàtores com IL-

1 β i TNF α i d'augmentar l'expressió de les antiinflamatòries com IL-10 (Wang et al., 2018; Ding et al., 2021; Li et al., 2021; Mou et al., 2021). De totes maneres, davant d'un estímul com l'LPS, s'ha descrit que la suplementació amb HMSeBA redueix la producció d'IL-1 β i TNF α mentre que no s'observen canvis en la producció d'IL-10 (Ding et al., 2021; Mou et al., 2021). Per tant, la suplementació amb HMSeBA en condicions fisiològiques augmentaria la producció de citocines antiinflamatòries, mentre que, en condicions fisiopatològiques, el seu efecte protector consistiria fonamentalment en disminuir la producció de citocines proinflamatòries. Així, la reducció en la producció d'IL-10 induïda per HMSeBA en cèl·lules estimulades suggereix que aquesta font orgànica modularia l'activació de macròfags a M1 en comptes d'afavorir la polarització cap a macròfags M2. De fet, la classificació típica de macròfags M1 i M2 està sent qüestionada. En aquest sentit, Mosser i Edwards (2008) suggereixen un altre model en el que els macròfags, enlloc de ser classificats en una escala lineal entre M1 i M2 (cadascun d'ells en els extrems de la línia), s'organitzen en base a les seves funcions principals. En aquesta organització, els macròfags tenen una plasticitat funcional que els permet modificar les seves funcions entre defensa de l'organisme, reparació de danys i regulació immunitària, tot dependent dels senyals de l'ambient en el que es troben.

Tot i que els macròfags suplementats amb HMSeBA podrien estar menys activats, es va observar que la presència d'aquesta font orgànica augmentava la capacitat fagocítica i bactericida del macròfag. Xu et al. (2020) van constatar que la capacitat fagocítica disminueix en macròfags deficientes en Se, i que la suplementació amb Se la incrementa (Safir et al., 2003; Suwuanpanya et al., 2007; Aribi et al., 2015). De totes maneres, el mecanisme implicat en la fagocitosis i en la modulació que el Se hi podria exercir no estan clars i caldria analitzar amb més profunditat els factors que hi intervenen. Tanmateix, els resultats podrien posar de relleu la capacitat de l'HMSeBA per afavorir la resposta immunitària innata amb conseqüències negatives mínimes per als teixits.



6. CONCLUSIONS

6.1. Estudi en cèl·lules intestinals Caco-2

Establiment del model de privació de Se en cèl·lules Caco-2.

- La privació de Se no afecta la viabilitat cel·lular tot i que produeix una disminució en el nombre de cèl·lules del cultiu.
- La privació de Se produeix una disminució de l'expressió gènica de GPX1 i de SELENOP, de l'activitat GPX i de l'expressió proteica de SELENOP, incrementa l'expressió gènica de GPX2 i no modifica l'activitat TXNRD.
- La privació de Se produeix un augment de la producció de ROS.

Efecte de la suplementació amb diferents fonts de Se en el model de privació de Se en cèl·lules Caco-2.

- La suplementació amb una font orgànica de Se molt estudiada com la Se-Met, no compromet la viabilitat cel·lular i incrementa l'expressió gènica de GPX1, GPX2 i SELENOP, l'activitat GPX i l'expressió proteica de SELENOP.
- La suplementació de les cèl·lules amb HMSeBA no compromet la viabilitat cel·lular en cap de les concentracions utilitzades i incrementa l'activitat GPX, l'expressió gènica de GPX1, GPX2 i SELENOP i l'expressió proteica de SELENOP.
- La suplementació amb una font inorgànica de Se com l'SS compromet la viabilitat cel·lular a concentracions més grans de 12,5 μ M. A 5 μ M augmenta l'activitat GPX i l'expressió proteica de SELENOP i no produeix cap efecte sobre l'expressió gènica de GPX1, GPX2 o SELENOP.

Efecte de la suplementació amb diferents fonts de Se sobre la producció de ROS, peroxidació lipídica i dany proteic induït per H₂O₂ en cèl·lules Caco-2.

- La suplementació de les cèl·lules amb 625 µM HMSeBA contraresta els efectes produïts per l'estimulació de les cèl·lules amb H₂O₂, produint una disminució en la producció de ROS.
- La suplementació amb 625 µM HMSeBA també disminueix la producció de productes secundaris d'oxidació com són els adductes 4-HNE i les carbonilacions proteiques.
- La suplementació amb SS no protegeix dels efectes produïts per l'H₂O₂.

Efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre la producció de ROS induïda per *Salmonella* Enteritidis en cèl·lules Caco-2.

- La suplementació de les cèl·lules amb 625 µM HMSeBA redueix la producció de ROS induïda per la inoculació del cultiu amb *Salmonella* Enteritidis.
- La presència d'HMSeBA al medi de cultiu no disminueix la viabilitat de *Salmonella* Enteritidis.

Els resultats indiquen que la retirada de l'FBS del medi de cultiu ocasiona una privació de Se que produeix estrès oxidatiu i posa de relleu l'existència d'una jerarquia en l'expressió de les selenoproteïnes. També s'observa que l'HMSeBA, així com la Se-Met, són utilitzats per les cèl·lules Caco-2 com a font de Se i són capaces de donar suport a l'activitat GPX i TXNRD i a l'expressió proteica de SELENOP. A diferència de l'SS, l'HMSeBA és capaç d'incrementar també l'expressió gènica de GPX1, GPX2 i SELENOP, així com de contrarestar els efectes produïts per l'H₂O₂ i *Salmonella* Enteritidis. Aquest increment en l'expressió gènica d'algunes selenoproteïnes indica que l'HMSeBA prepararia millor les cèl·lules per a sintetitzar selenoproteïnes ràpidament, quan el Se torna a estar disponible, millorant així la seva resposta davant l'estrès oxidatiu.

6.2. Estudi en macròfags derivats de monòcits THP-1

Establiment del model de privació de Se en macròfags.

- La privació de Se no afecta la viabilitat cel·lular, però produeix una disminució del creixement cel·lular.
- La privació de Se produeix una disminució de l'activitat GPX, de l'expressió proteica de SELENOP i de l'expressió gènica de GPX1 i SELENOP.
- La privació de Se produeix un augment de la producció de ROS.

Efecte de la suplementació amb HMSeBA en el model de privació de Se en macròfags.

- La suplementació de les cèl·lules amb HMSeBA no compromet la viabilitat cel·lular en cap de les concentracions utilitzades i incrementa l'expressió gènica de GPX1 i SELENOP.

Efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre la producció de ROS induïda per H₂O₂ en macròfags.

- La suplementació de les cèl·lules amb HMSeBA contraresta els efectes produïts per l'estimulació amb H₂O₂, disminuint la producció de ROS.

Efecte de la suplementació amb HMSeBA sobre l'expressió gènica de GPX1, la producció de ROS, la producció de citocines i la capacitat fagocítica i bactericida en macròfags estimulats amb LPS.

- L'estimulació de les cèl·lules amb LPS altera l'expressió gènica de GPX1 en totes les condicions assajades.

- La suplementació amb HMSeBA dels macròfags estimulats amb LPS incrementa l'expressió gènica de GPX1. La suplementació amb NAC no modifica l'expressió gènica de GPX1 en la majoria de les condicions assajades.
- En presència d'FBS, l'estimulació de les cèl·lules amb LPS produeix un increment en la producció de ROS i en l'autofluorescència emesa per les cèl·lules. L'absència d'FBS no altera cap d'aquestes dues variables.
- En presència d'FBS, la suplementació amb HMSeBA dels macròfags estimulats amb LPS disminueix la producció de ROS. La suplementació amb NAC disminueix la producció de ROS en totes les condicions assajades.
- L'estimulació dels macròfags amb LPS produeix un increment en la producció de les citocines TNF α , IL-1 β i IL-10 tant en absència com en presència d'FBS, assolint valors majors en aquesta última condició.
- La suplementació dels macròfags amb HMSeBA o NAC disminueix la producció de citocines proinflamatòries, especialment en presència d'FBS.
- La suplementació dels macròfags amb HMSeBA o NAC incrementa la capacitat fagocítica i bactericida.

Els resultats indiquen que la retirada de l'FBS del medi de cultiu ocasiona una privació de Se que produeix estrès oxidatiu. També s'observa que l'HMSeBA és utilitzat pels macròfags com a font de Se i que és capaç d'incrementar l'expressió gènica de GPX1 i SELENOP, així com de contrarestar els efectes produïts per l'H₂O₂. La suplementació amb HMSeBA de les cèl·lules estimulades amb LPS, disminueix la producció de citocines proinflamatòries i incrementa la capacitat fagocítica i bactericida, contribuint així a evitar els efectes nocius produïts per macròfags extremadament activats.

En conclusió, l'HMSeBA és utilitzat tant per les cèl·lules Caco-2 com per macròfags com a font orgànica de Se i contribueix al manteniment de l'homeòstasi de l'epiteli intestinal, incrementant l'expressió de selenoproteïnes, protegint-lo de l'estrès oxidatiu i modulant positivament la resposta inflamatòria de macròfags en condicions d'estrès.

6.1. Study in intestinal Caco-2 cells

Se deprivation model establishment in Caco-2 cells.

- Se deprivation does not affect cell viability but decreases cell number in the culture.
- Se deprivation decreases GPX1 and SELENOP gene expression, GPX activity and SELENOP protein expression, increases GPX2 gene expression and does not modify TXNRD activity.
- Se deprivation increases ROS production.

Effect of different Se sources supplementation in the Se-deprived model in Caco-2 cells.

- Supplementation with a well-studied organic Se source such as Se-Met does not compromise cell viability and increases GPX1, GPX2 and SELENOP gene expression, GPX activity and SELENOP protein expression.
- Supplementation with HMSeBA does not compromise cell viability in any of the concentrations used and increases GPX1, GPX2 and SELENOP gene expression, GPX activity and SELENOP protein expression.
- Supplementation with an inorganic Se source such as SS compromises cell viability with higher concentrations than 12,5 μM . At 5 μM increases GPX activity and SELENOP protein expression and has no effect on GPX1, GPX2 or SELENOP gene expression.

Effect of different Se sources supplementation on ROS production, lipid peroxidation and protein damage induced by H_2O_2 in Caco-2 cells.

- Supplementation with 625 μM HMSeBA counteracts the effects produced by stimulation of cells with H_2O_2 , decreasing ROS production.

- Supplementation with 625 μ M HMSeBA decreases secondary oxidation products such as 4-HNE adducts and protein carbonylation.
- Supplementation with SS doesn't counteract the effects produced by H₂O₂.

Effect of HMSeBA supplementation on ROS production induced by *Salmonella* Enteritidis in Caco-2 cells.

- Supplementation with 625 μ M HMSeBA decreases ROS production induced by *Salmonella* Enteritidis.
- The presence of HMSeBA in the culture media doesn't decrease *Salmonella* Enteritidis viability.

These results indicate that FBS removal from the cell culture media produces a Se deprivation as well as an oxidative stress and shows the existence of a selenoprotein expression hierarchy. It is also observed that HMSeBA, as well as Se-Met, are used by Caco-2 cells as an organic Se source and that are capable of increasing GPX and TXNRD activity as well as SELENOP protein expression. Furthermore, in contrast to SS, HMSeBA is capable of increasing GPX1, GPX2 and SELENOP gene expression as well as efficiently counteract the effects of H₂O₂ and *Salmonella* Enteritidis. The increase in the gene expression of some selenoproteins shows that HMSeBA would allow the cell to rapidly synthesize selenoproteins when Se becomes available again, resulting in an enhanced protection against oxidative stress.

6.2. Study in derived THP-1 monocyte macrophages

Se deprivation model establishment in macrophages.

- Se deprivation does not affect cell viability but decreases cell number in the culture.
- Se deprivation decreases GPX activity, SELENOP protein expression and GPX1 and SELENOP gene expression.
- Se deprivation increases ROS production.

Effect of HMSeBA supplementation in the Se-deprived model in macrophages.

- Supplementation with HMSeBA does not compromise cell viability in any of the concentrations used and increases GPX1 and SELENOP gene expression.

Effect of HMSeBA supplementation on ROS production induced by H₂O₂ in macrophages.

- Supplementation with HMSeBA counteracts the effects produced by stimulation of cells with H₂O₂, decreasing ROS production.

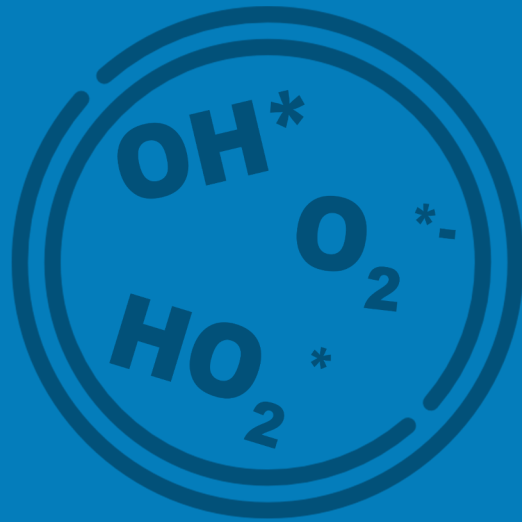
Effect of HMSeBA supplementation on GPX1 gene expression, ROS production, cytokine production and phagocytic and killing capacity induced by LPS in macrophages.

- LPS cell stimulation alters GPX1 gene expression in all conditions tested.
- Supplementation with HMSeBA of LPS-stimulated macrophages increases GPX1 gene expression in all conditions tested. Supplementation with NAC does not have any effect on GPX1 gene expression in virtually all conditions tested.
- In presence of FBS, LPS cell stimulation increases ROS production and cell autofluorescence. There are no changes in these variables in absence of FBS.
- In presence of FBS, supplementation with HMSeBA of LPS-stimulated macrophages decreases ROS production. Supplementation with NAC decreases ROS production in all conditions tested.

- LPS macrophage stimulation increases $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and IL-10 cytokine production both in absence or presence of FBS, reaching higher values in the last condition mentioned.
- Supplementation with HMSeBA or NAC decreases pro-inflammatory cytokine production, especially in presence of FBS.
- Supplementation with HMSeBA or NAC increases macrophage phagocytic and killing capacity.

These results indicate that FBS removal from cell culture media produces a Se deprivation as well as an oxidative stress. It is also observed that HMSeBA is used by macrophages as an organic Se source and that is capable of increasing GPX1 and SELENOP gene expression, as well as counteract the effects produced by H_2O_2 . HMSeBA supplementation of LPS-stimulated macrophages, decreases proinflammatory cytokine production and increases its phagocytic and killing capacity, therefore contributing to avoid the potential toxic insult produced by highly activated macrophages.

In conclusion, HMSeBA is used by Caco-2 cells and macrophages as an organic Se source and contributes to maintain intestinal epithelial homeostasis by increasing selenoproteins expression, protecting it against oxidative stress and positively modulating the inflammatory response of macrophages under stressed conditions.



7. BIBLIOGRAFIA

Alimohamady R, Aliarabi H, Bahari A, Dezfoulian AH. Influence of different amounts and sources of selenium supplementation on performance, some blood parameters, and nutrient digestibility in lambs. *Biol Trace Elem Res.* 2013;154:45-54. doi: 10.1007/s12011-013-9698-4.

Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5:491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491.

Aribi M, Meziane W, Habi S, Boulatika Y, Marchandin H, Aymeric JL. Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLoS One.* 2015;10:e0135515. doi: 10.1371/journal.pone.0135515.

Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients.* 2018;10:1203. doi: 10.3390/nu10091203.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438.

Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohé R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol.* 2005;25:4914-4923. doi: 10.1128/MCB.25.12.4914-4923.2005.

Bansal MP, Kaur T. Growth characteristics and selenium status changes of yeast cells with inorganic and organic selenium supplementation: selenium, a chemopreventive agent. *J Med Food.* 2002;5:85-90. doi: 10.1089/109662002760178168.

Barrera LN, Cassidy A, Wang W, Wei T, Belshaw NJ, Johnson IT, Brigelius-Flohé R, Bao Y. TrxR1 and GPx2 are potently induced by isothiocyanates and selenium, and mutually cooperate to protect Caco-2 cells against free radical-mediated cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823:1914-1924. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.07.007.

Barrett CW, Short SP, Williams CS. Selenoproteins and oxidative stress-induced inflammatory tumorigenesis in the gut. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:607-616. doi: 10.1007/s00018-016-2339-2.

Berghman LR. Immune responses to improving welfare. *Poult Sci*. 2016;95:2216-2218. doi: 10.3382/ps/pew159.

Bermano G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J*. 1995;311:425-430. doi: 10.1042/bj3110425.

Bosschaerts T, Guilliams M, Noel W, Hérin M, Burk RF, Hill KE, Brys L, Raes G, Ghassabeh GH, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated myeloid cells limit pathogenicity associated with African trypanosomiasis through the IL-10 inducible gene selenoprotein P. *J Immunol*. 2008;180:6168-6175. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6168.

Brandt-Kjelsen A, Salbu B, Haug A, and Szpunar J. Selenium requirements and metabolism in poultry. *A Poultry Science*, 2017. Manafi M. ed., IntechOpen, Londres, Regne Unit.

Briens M, Mercier Y, Rouffineau F, Vacchina V, Geraert PA. Comparative study of a new organic selenium source v. seleno-yeast and mineral selenium sources on muscle selenium enrichment and selenium digestibility in broiler chickens. *Br J Nutr*. 2013;110:617-624. doi: 10.1017/S0007114512005545.

Briens M, Mercier Y, Rouffineau F, Mercierand F, Geraert PA. 2-Hydroxy-4-methylselenobutanoic acid induces additional tissue selenium enrichment in broiler chickens compared with other selenium sources. *Poult Sci.* 2014;93:85-93. doi: 10.3382/ps.2013-03182.

Broom LJ. Gut barrier function: Effects of (antibiotic) growth promoters on key barrier components and associations with growth performance. *Poult Sci.* 2018;97:1572-1578. doi: 10.3382/ps/pey021.

Brufau MT, Campo-Sabariz J, Bou R, Carné S, Brufau J, Vilà B, Marqués AM, Guardiola F, Ferrer R, Martín-Venegas R. Salmosan, a β -Galactomannan-Rich Product, Protects Epithelial Barrier Function in Caco-2 Cells Infected by *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *J Nutr.* 2016;146:1492-1498. doi: 10.3945/jn.116.232546.

Brufau MT, Campo-Sabariz J, Carné S, Ferrer R, Martín-Venegas R. Salmosan, a β -galactomannan-rich product, in combination with *Lactobacillus plantarum* contributes to restore intestinal epithelial barrier function by modulation of cytokine production. *J Nutr Biochem.* 2017;41:20-24. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.11.011.

Burk RF, Hill KE. Regulation of Selenium Metabolism and Transport. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:109-134. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034250.

Campo-Sabariz J, Moral-Anter D, Brufau MT, Briens M, Pinloche E, Ferrer R, Martín-Venegas R. 2-Hydroxy-(4-methylseleno)butanoic Acid Is Used by Intestinal Caco-2 Cells as a Source of Selenium and Protects against Oxidative Stress. *J Nutr.* 2019;149:2191-2198. doi: 10.1093/jn/nxz190.

Carlson BA, Yoo MH, Sano Y, Sengupta A, Kim JY, Irons R, Gladyshev VN, Hatfield DL, Park JM. Selenoproteins regulate macrophage invasiveness and extracellular matrix-related gene expression. *BMC Immunol.* 2009;10:57. doi: 10.1186/1471-2172-10-57.

Circu ML, Aw TY. Redox biology of the intestine. *Free Radic Res.* 2011;45:1245-1266. doi: 10.3109/10715762.2011.611509.

Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2014;262:153-166. doi: 10.1111/imr.12218.

Combs GF Jr. Biomarkers of selenium status. *Nutrients.* 2015;7:2209-2236. doi: 10.3390/nu7042209.

De Kivit S, Tobin MC, Forsyth CB, Keshavarzian A, Landay AL. Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics. *Front Immunol.* 2014;5:60. doi: 10.3389/fimmu.2014.00060.

De Spirt S, Eckers A, Wehrend C, Micoogullari M, Sies H, Stahl W, Steinbrenner H. Interplay between the chalcone cardamonin and selenium in the biosynthesis of Nrf2-regulated antioxidant enzymes in intestinal Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med.* 2016;91:164-171. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.011.

Dhanjal NIK, Sharma S, Prabhu KS, Prakash NT. Selenium supplementation through Se-rich dietary matrices can upregulate the anti-inflammatory responses in lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *Food Agric Immunol.* 2017;28:1374-1392. doi: 10.1080/09540105.2017.1343805.

Ding D, Mou D, Zhao L, Jiang X, Che L, Fang Z, Xu S, Lin Y, Zhuo Y, Li J, Huang C, Zou Y, Li L, Wu D, Feng B. Maternal organic selenium supplementation alleviates LPS induced inflammation, autophagy and ER stress in the thymus and spleen of offspring piglets by improving the expression of selenoproteins. *Food Funct.* 2021;12:11214-11228. doi: 10.1039/d1fo01653a.

Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal Bioanal Chem.* 2006;385:1304-1323. doi: 10.1007/s00216-006-0529-8.

Edelson JD, MacFadden DK, Klein M, Rebeck AS. Autofluorescence of alveolar macrophages: problems and potential solutions. *Med Hypotheses.* 1985;17:403-407. doi: 10.1016/0306-9877(85)90099-4.

Edens FW, Gowdy KM. Selenium sources and selenoproteins in practical poultry production. *A Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries: Proceedings of Alltech's 20th Annual Symposium: re-imagining the feed industry, 2004.* Lyons TP, Jacques KA ed., Lexington, Kentucky, EUA.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). Scientific Opinion on the safety and efficacy of L-selenomethionine as feed additive for all animal species. *EFSA Journal.* 2013;11:3219. doi:10.2903/j.efsa.2013.3219. En línia a <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3219>. Darrer accés 17 Novembre 2021.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). Scientific Opinion on safety and efficacy of hydroxy-analogue of selenomethionine as feed additive for all species. EFSA Journal. 2013;11:3046. doi:10.2903/j.efsa.2013.3046. En línia a <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2013.3046>. Darrer accés 17 Novembre 2021.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). Scientific Opinion on the safety and efficacy of DL-selenomethionine as a feed additive for all animal species. EFSA Journal. 2014;12:3567. doi:10.2903/j.efsa.2014.3567. En línia a <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2014.3567>. Darrer accés 17 Novembre 2021.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). Scientific opinion on the safety and efficacy of selenium compounds (E8) as feed additives for all animal species: sodium selenite, based on a dossier submitted by Todini and Co SpA. EFSA Journal. 2016;14:4442. doi:10.2903/j.efsa.2016.4442. En línia a <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2016.4442>. Darrer accés 17 Novembre 2021.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, Bastos ML, Bories G, Chesson A, Cocconcelli PS, Flachowsky G, Gropp J, Kolar B, Kouba M, López-Alonso M, López Puente S, Mayo B, Ramos F, Saarela M, Villa RE, Wallace RJ, Wester P, Pechova A, López-Gálvez G and Mantovani A. Scientific Opinion on the safety and efficacy of Zinc-L-Selenomethionine as feed additive for all animal species. EFSA Journal. 2018;16:5197. En línia a <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5197>. Darrer accés 17 Novembre 2021.

Esworthy RS, Kim BW, Larson GP, Yip ML, Smith DD, Li M, Chu FF. Colitis locus on chromosome 2 impacting the severity of early-onset disease in mice deficient in GPX1 and GPX2. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:1373-86. doi: 10.1002/ibd.21479.

Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2012;1:10-16. doi: 10.1089/wound.2011.0307.

Fisinin VI, Papazyan TT, Surai PF. Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population. *Crit Rev Biotechnol*. 2009;29:18-28. doi: 10.1080/07388550802658030.

Gerberick GF, Willoughby JB, Willoughby WF. Serum factor requirement for reactive oxygen intermediate release by rabbit alveolar macrophages. *J Exp Med*. 1985;161:392-408. doi: 10.1084/jem.161.2.392.

Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001;13:85-94. doi: 10.1016/s0898-6568(00)00149-2.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989;96:736-49.

Hoefig CS, Renko K, Köhrle J, Birringer M, Schomburg L. Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture. *J Nutr Biochem*. 2011;22:945-955. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.08.006.

Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;396:120-124. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.083.

Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16:705-743. doi: 10.1089/ars.2011.4145.

Hu Y, McIntosh GH, Le Leu RK, Young GP. Selenium-enriched milk proteins and selenium yeast affect selenoprotein activity and expression differently in mouse colon. *Br J Nutr*. 2010;104:17-23. doi: 10.1017/S0007114510000309.

Jian ZJ, Yang Z, Mason GL, Slauson DO, Bochsler PN. Regulation of superoxide anion generation in bovine alveolar macrophages by bacterial lipopolysaccharide, serum proteins, and modulators of signal transduction. *Inflammation*. 1995;19:637-650. doi: 10.1007/BF01534568.

Jlali M, Briens M, Rouffineau F, Mercierand F, Geraert PA, Mercier Y. Effect of 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid as a dietary selenium supplement to improve the selenium concentration of table eggs. *J Anim Sci*. 2013;91:1745-1752. doi: 10.2527/jas.2012-5825.

Juniper DT, Rymer C, Briens M. Bioefficacy of hydroxy-selenomethionine as a selenium supplement in pregnant dairy heifers and on the selenium status of their calves. *J Dairy Sci*. 2019;102:7000-7010. doi: 10.3168/jds.2018-16065.

Khan MT, Mahmud A, Zahoor I, Javed K. Organic and inorganic selenium in Aseel chicken diets: Effect on hatching traits. *Poult Sci*. 2017;96:1466-1472. doi: 10.3382/ps/pew403.

Kim JA, Ahn BN, Kong CS, Kim SK. Anti-inflammatory action of sulfated glucosamine on cytokine regulation in LPS-activated PMA-differentiated THP-1 macrophages. *Inflamm Res*. 2011;60:1131-1138. doi: 10.1007/s00011-011-0377-7.

Kim SH, Johnson VJ, Shin TY, Sharma RP. Selenium attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress responses through modulation of p38 MAPK and NF-kappaB signaling pathways. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:203-213. doi: 10.1177/153537020422900209.

Kipp A, Banning A, van Schothorst EM, Méplan C, Schomburg L, Evelo C, Coort S, Gaj S, Keijer J, Hesketh J, Brigelius-Flohé R. Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon. *Mol Nutr Food Res*. 2009;53:1561-1572. doi: 10.1002/mnfr.200900105.

Kipp AP, Müller MF, Göken EM, Deubel S, Brigelius-Flohé R. The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:1588-1596. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.05.016.

Kogut MH, Arsenault RJ. Immunometabolic Phenotype Alterations Associated with the Induction of Disease Tolerance and Persistent Asymptomatic Infection of Salmonella in the Chicken Intestine. *Front Immunol*. 2017;8:372. doi: 10.3389/fimmu.2017.00372.

Krifka S, Hiller KA, Spagnuolo G, Jewett A, Schmalz G, Schweikl H. The influence of glutathione on redox regulation by antioxidant proteins and apoptosis in macrophages exposed to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Biomaterials*. 2012;33:5177-5186. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.013.

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 2003;300:1439-1443. doi: 10.1126/science.1083516.

Kudva AK, Shay AE, Prabhu KS. Selenium and inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309:G71-77. doi: 10.1152/ajpgi.00379.2014.

Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev.* 2014;94:739-777. doi: 10.1152/physrev.00039.2013.

Leblondel G, Mauras Y, Cailleux A, Allain P. Transport measurements across Caco-2 monolayers of different organic and inorganic selenium: influence of sulfur compounds. *Biol Trace Elem Res.* 2001;83:191-206. doi: 10.1385/BTER:83:3:191.

Li Z, Dong Y, Chen S, Jia X, Jiang X, Che L, Lin Y, Li J, Feng B, Fang Z, Zhuo Y, Wang J, Xu H, Wu D, Xu S. Organic Selenium Increased Gilts Antioxidant Capacity, Immune Function, and Changed Intestinal Microbiota. *Front Microbiol.* 2021;12:723190. doi: 10.3389/fmicb.2021.723190.

Lyons MP, Papazyan TT, Surai PF. Selenium in food chain and animal nutrition: lessons from nature-review. *Asian Australas J Anim Sci.* 2007;20:1135-1155

Maciel-Dominguez A, Swan D, Ford D, Hesketh J. Selenium alters miRNA profile in an intestinal cell line: evidence that miR-185 regulates expression of GPX2 and SEPSH2. *Mol Nutr Food Res.* 2013;57:2195-2205. doi: 10.1002/mnfr.201300168.

Mangiapane E, Pessione A, Pessione E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems. *Curr Protein Pept Sci.* 2014;15:598-607. doi: 10.2174/1389203715666140608151134.

Marek Kieliszek, Stanisław Błażej. Current Knowledge on the Importance of Selenium in Food for Living Organisms: A Review. *Molecules*. 2016;21:609. doi: 10.3390/molecules21050609.

Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13. doi: 10.12703/P6-13.

Martín-Venegas R, Geraert PA, Ferrer R. Conversion of the methionine hydroxy analogue DL-2-hydroxy-(4-methylthio) butanoic acid to sulfur-containing amino acids in the chicken small intestine. *Poult Sci*. 2006;85:1932-1938. doi: 10.1093/ps/85.11.1932.

Martín-Venegas R, Brufau MT, Mercier Y, Geraert PA, Ferrer R. Intestinal cell conversion of DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid in vitro: dietary up-regulation by this methionine precursor. *Br J Nutr*. 2011;106:350-356. doi: 10.1017/S0007114511000183.

Martín-Venegas R, Brufau MT, Guerrero-Zamora AM, Mercier Y, Geraert PA, Ferrer R. The methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid protects intestinal epithelial barrier function. *Food Chem*. 2013;141:1702-1709. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.081.

Martín-Venegas R, Brufau MT, Mañas-Cano O, Mercier Y, Nonis MK, Ferrer R. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in Caco-2 cells by the methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid. *Vet J*. 2014;202:555-560. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.09.019.

Maseko T, Howell K, Dunshea FR, Ng K. Selenium-enriched *Agaricus bisporus* increases expression and activity of glutathione peroxidase-1 and expression of glutathione peroxidase-2 in rat colon. *Food Chem.* 2014;146:327-333. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.074.

Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* 2012;489:231-241. doi: 10.1038/nature11551.

McCartney E. Selenio, un nutriente esencial para humanos y aves. *Selecciones Avícolas.* 2007. En línea a <https://seleccionesavicolas.com/pdf-files/2007/2/3152-selenio-un-nutriente-esencial-para-humanos-y-aves.pdf>. Darrer accés 12 Gener 2022.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:958-969. doi: 10.1038/nri2448.

Mou D, Ding D, Yang M, Jiang X, Zhao L, Che L, Fang Z, Xu S, Lin Y, Zhuo Y, Li J, Huang C, Zou Y, Li L, Wu D, Feng B. Maternal organic selenium supplementation during gestation improves the antioxidant capacity and reduces the inflammation level in the intestine of offspring through the NF- κ B and ERK/Beclin-1 pathways. *Food Funct.* 2021;12:315-327. doi: 10.1039/d0fo02274h.

Mousa R, Notis Dardashti R, Metanis N. Selenium and Selenocysteine in Protein Chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2017;56:15818-15827. doi: 10.1002/anie.201706876.

Müller C, Wingler K, Brigelius-Flohé R. 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol Chem.* 2003;384:11-18. doi: 10.1515/BC.2003.002.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41:14-20. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.008.

National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry, 1994, 9a edición. The National Academies Press, Washington DC, EUA.

Nelson SM, Lei X, Prabhu KS. Selenium levels affect the IL-4-induced expression of alternative activation markers in murine macrophages. *J Nutr*. 2011;141:1754-1761. doi: 10.3945/jn.111.141176.

Nickel A, Kottra G, Schmidt G, Danier J, Hofmann T, Daniel H. Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters. *Chem Biol Interact*. 2009;17:234-241. doi: 10.1016/j.cbi.2008.09.008.

Njoroge JM, Mitchell LB, Centola M, Kastner D, Raffeld M, Miller JL. Characterization of viable autofluorescent macrophages among cultured peripheral blood mononuclear cells. *Cytometry*. 2001;44:38-44. doi: 10.1002/1097-0320(20010501)44:1<38::aid-cyto1080>3.0.co;2-t.

Palacio JR, Markert UR, Martínez P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflamm Res*. 2011;60:695-704. doi: 10.1007/s00011-011-0323-8.

Pankow W, Neumann K, Rüschoff J, von Wichert P. Human alveolar macrophages: comparison of cell size, autofluorescence, and HLA-DR antigen expression in smokers and nonsmokers. *Cancer Detect Prev*. 1995;19:268-273.

Parmentier M, Hirani N, Rahman I, Donaldson K, MacNee W, Antonicelli F. Regulation of lipopolysaccharide-mediated interleukin-1beta release by N-acetylcysteine in THP-1 cells. *Eur Respir J.* 2000;16:933-939. doi: 10.1183/09031936.00.16593300.

Prabhu KS, Zamamiri-Davis F, Stewart JB, Thompson JT, Sordillo LM, Reddy CC. Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-kappaB in up-regulation. *Biochem J.* 2002;366:203-209. doi: 10.1042/BJ20020256.

Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Velickovic L, Sokolovic D, Stoiljkovic M, Ilic I. Protective effect of selenium on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2012;35:141-148. doi: 10.3109/01480545.2011.589446.

Ravindran V, Son JH. Feed enzyme technology: present status and future developments. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 2011;3:102-109. doi: 10.2174/2212798411103020102.

Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics.* 2014;6:25-54. doi: 10.1039/c3mt00185g.

Rószter T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:816460. doi: 10.1155/2015/816460.

Ryan KA, Smith MF Jr, Sanders MK, Ernst PB. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infect Immun.* 2004;72:2123-2130. doi: 10.1128/IAI.72.4.2123-2130.2004.

Safir N, Wendel A, Saile R, Chabraoui L. The effect of selenium on immune functions of J774.1 cells. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41:1005-1011. doi: 10.1515/CCLM.2003.154.

Sahin N, Onderci M, Sahin K, Kucuk O. Supplementation with organic or inorganic selenium in heat-distressed quail. *Biol Trace Elem Res.* 2008;122:229-237. doi: 10.1007/s12011-007-8075-6.

Salinas G. Bioquímica de la selenocisteína, el 21er aminoácido, y rol de las selenoproteínas en la salud humana. *Mensaje Bioquímico.* 2010;34:121-133.

Schoenmakers E, Carlson B, Agostini M, Moran C, Rajanayagam O, Bochukova E, Tobe R, Peat R, Gevers E, Muntoni F, Guicheney P, Schoenmakers N, Farooqi S, Lyons G, Hatfield D, Chatterjee K. Mutation in human selenocysteine transfer RNA selectively disrupts selenoprotein synthesis. *J Clin Invest.* 2016;126:992-996. doi: 10.1172/JCI84747.

Schrauzer GN. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J Nutr.* 2000;130:1653-1656. doi: 10.1093/jn/130.7.1653.

Schrauzer GN. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. *Adv Food Nutr Res.* 2003;47:73-112. doi: 10.1016/s1043-4526(03)47002-2.

Schrauzer GN, Surai PF. Selenium in human and animal nutrition: resolved and unresolved issues. A partly historical treatise in commemoration of the fiftieth anniversary of the discovery of the biological essentiality of selenium, dedicated to the memory of Klaus Schwarz (1914-1978) on the occasion of the thirtieth anniversary of his death. *Crit Rev Biotechnol.* 2009;29:2-9. doi: 10.1080/07388550902728261.

Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Am Chem Soc.* 1957;79:3292-3293.

Setta A, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA. Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF- κ B signalling and cell cytotoxicity. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;146:212-224. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.03.008.

Seyedali A, Berry MJ. Nonsense-mediated decay factors are involved in the regulation of selenoprotein mRNA levels during selenium deficiency. *RNA.* 2014;20:1248-1256. doi: 10.1261/rna.043463.113.

Short SP, Pilat JM, Williams CS. Roles for selenium and selenoprotein P in the development, progression, and prevention of intestinal disease. *Free Radic Biol Med.* 2018;127:26-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.066.

Sköld CM, Eklund A, Halldén G, Hed J. Autofluorescence in human alveolar macrophages from smokers: relation to cell surface markers and phagocytosis. *Exp Lung Res.* 1989;15:823-835. doi: 10.3109/01902148909069629.

Song E, Su C, Fu J, Xia X, Yang S, Xiao C, Lu B, Chen H, Sun Z, Wu S, Song Y. Selenium supplementation shows protective effects against patulin-induced brain damage in mice via increases in GSH-related enzyme activity and expression. *Life Sci.* 2014;109:37-43. doi: 10.1016/j.lfs.2014.05.022.

Speckmann B, Bidmon HJ, Pinto A, Anlauf M, Sies H, Steinbrenner H. Induction of glutathione peroxidase 4 expression during enterocytic cell differentiation. *J Biol Chem.* 2011;286:10764-10772. doi: 10.1074/jbc.M110.216028.

Speckmann B, Bidmon HJ, Borchardt A, Sies H, Steinbrenner H. Intestinal selenoprotein P in epithelial cells and in plasma cells. *Arch Biochem Biophys*. 2014;541:30-36. doi: 10.1016/j.abb.2013.10.011.

Stoffaneller R, Morse NL. A review of dietary selenium intake and selenium status in Europe and the Middle East. *Nutrients*. 2015;7:1494-537. doi: 10.3390/nu7031494.

Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS. The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:495-549. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064816.

Sun L, Wang F, Wu Z, Ma L, Baumrucker C, Bu D. Comparison of Selenium Source in Preventing Oxidative Stress in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Animals (Basel)*. 2020;10:842. doi: 10.3390/ani10050842.

Surai PF. Selenium in poultry nutrition 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. *Worlds Poult Sci J*. 2002;58:333-347. doi:10.1079/WPS20020026

Surai PF. Selenium in Nutrition and Health, 2006. Nottingham University Press, Nottingham, Regne Unit.

Surai PF, Kochish II, Fisinin VI, Velichko OA. Selenium in Poultry Nutrition: from Sodium Selenite to Organic Selenium Sources. *J Poult Sci*. 2018;55:79-93. doi: 10.2141/jpsa.0170132.

Surai PF, Kochish II, Fisinin VI, Kidd MT. Antioxidant Defence Systems and Oxidative Stress in Poultry Biology: An Update. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8:235. doi: 10.3390/antiox8070235.

Surai PF, Kochish II, Kidd MT. Redox Homeostasis in Poultry: Regulatory Roles of NF- κ B. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10:186. doi: 10.3390/antiox10020186.

Suwanpanya N, Wongpratoom W, Wanapat M, Aiumlamai S, Wittayakun S, Wachirapakorn C. The influence of bovine neutrophils on in vitro phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* in heifers supplemented with selenium and vitamin E. *J Sci Technol*. 2007;29:697-706.

Takahashi K, Suzuki N, Ogra Y. Bioavailability Comparison of Nine Bioselenocompounds In Vitro and In Vivo. *Int J Mol Sci*. 2017;18:506. doi: 10.3390/ijms18030506.

Thiry C, Ruttens A, De Temmerman L, Schneider YJ, Pussemier L. Current Knowledge in Species-related Bioavailability of Selenium in Food. *Food Chem*. 2012;130:767–784. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.102

Turner RJ, J M Finch. Selenium and the immune response. *Proc Nutr Soc* 1991;50:275-285. doi: 10.1079/pns19910037.

Verstovsek S, Zaleskis G, Maccubbin DL, Mihich E, Ehrke MJ. Lipopolysaccharide and splenic tumoricidal macrophage activation. *J Leukoc Biol*. 1994;56:714-722. doi: 10.1002/jlb.56.6.714.

Vunta H, Davis F, Palempalli UD, Bhat D, Arner RJ, Thompson JT, Peterson DG, Reddy CC, Prabhu KS. The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. *J Biol Chem*. 2007;282:17964-17973. doi: 10.1074/jbc.M703075200.

Vunta H, Belda BJ, Arner RJ, Channa Reddy C, Vanden Heuvel JP, Sandeep Prabhu K. Selenium attenuates pro-inflammatory gene expression in macrophages. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52:1316-1323. doi: 10.1002/mnfr.200700346.

Wang G, Zhan Q, Wu H. Suppression of lipopolysaccharide-induced activation of RAW 264.7 macrophages by Se-methylseleno-l-cysteine. *Int Immunopharmacol*. 2020;89:107040. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107040.

Wang L, Jing J, Yan H, Tang J, Jia G, Liu G, Chen X, Tian G, Cai J, Shang H, Zhao H. Selenium Pretreatment Alleviated LPS-Induced Immunological Stress Via Upregulation of Several Selenoprotein Encoding Genes in Murine RAW264.7 Cells. *Biol Trace Elem Res*. 2018;186:505-513. doi: 10.1007/s12011-018-1333-y.

Wang Y, Fu L. Forms of selenium affect its transport, uptake and glutathione peroxidase activity in the Caco-2 cell model. *Biol Trace Elem Res*. 2012;149:110-116. doi: 10.1007/s12011-012-9395-8.

Wingler K, Müller C, Schmehl K, Florian S, Brigelius-Flohé R. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology*. 2000;119:420-430. doi: 10.1053/gast.2000.9521.

Wingler K, Müller C, Brigelius-Flohé R. Stability of gastrointestinal glutathione peroxidase mRNA in selenium deficiency depends on its 3'UTR. *Biofactors*. 2001;14:43-50. doi: 10.1002/biof.5520140107.

Wolfram T, Weidenbach LM, Adolf J, Schwarz M, Schädel P, Gollowitzer A, Werz O, Koeberle A, Kipp AP, Koeberle SC. The Trace Element Selenium Is Important for Redox Signaling in Phorbol Ester-Differentiated THP-1 Macrophages. *Int J Mol Sci*. 2022;22:11060. doi: 10.3390/ijms222011060.

Xu J, Gong Y, Sun Y, Cai J, Liu Q, Bao J, Yang J, Zhang Z. Impact of Selenium Deficiency on Inflammation, Oxidative Stress, and Phagocytosis in Mouse Macrophages. *Biol Trace Elem Res.* 2020;194:237-243. doi: 10.1007/s12011-019-01775-7.

Yuan D, Zheng L, Guo XY, Wang YX, Zhan XA. Regulation of selenoprotein P concentration and expression by different sources of selenium in broiler breeders and their offspring. *Poult Sci.* 2013;92:2375-2380. doi: 10.3382/ps.2013-03155.

Zeng H, Botnen JH, Johnson LK. A selenium-deficient Caco-2 cell model for assessing differential incorporation of chemical or food selenium into glutathione peroxidase. *Biol Trace Elem Res.* 2008;123:98-108. doi: 10.1007/s12011-008-8097-8.

Zhang W, Zhang R, Wang T, Jiang H, Guo M, Zhou E, Sun Y, Yang Z, Xu S, Cao Y, Zhang N. Selenium inhibits LPS-induced pro-inflammatory gene expression by modulating MAPK and NF- κ B signaling pathways in mouse mammary epithelial cells in primary culture. *Inflammation.* 2014;37:478-485. doi: 10.1007/s10753-013-9761-5.

Zhao L, Sun LH, Huang JQ, Briens M, Qi DS, Xu SW, Lei XG. A Novel Organic Selenium Compound Exerts Unique Regulation of Selenium Speciation, Selenome, and Selenoproteins in Broiler Chicks. *J Nutr.* 2017;147:789-797. doi: 10.3945/jn.116.247338.

Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014;26:192-197. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.004.

Zhuang C, Liu G, Barkema HW, Zhou M, Xu S, Ur Rahman S, Liu Y, Kastelic JP, Gao J, Han B. Selenomethionine Suppressed TLR4/NF- κ B Pathway by Activating Selenoprotein S to Alleviate ESBL Escherichia coli-Induced Inflammation in Bovine Mammary Epithelial Cells and Macrophages. *Front Microbiol.* 2020;11:1461. doi: 10.3389/fmicb.2020.01461.



8. ANNEX

2-Hydroxy-(4-methylseleno)butanoic Acid Is Used by Intestinal Caco-2 Cells as a Source of Selenium and Protects against Oxidative Stress

Joan Campo-Sabariz,^{1,2} David Moral-Anter,^{1,2} M Teresa Brufau,^{1,2} Mickael Briens,³ Eric Pinloche,³ Ruth Ferrer,^{1,2} and Raquel Martín-Venegas^{1,2}

¹Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

²Nutrition and Food Safety Research Institute, University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ³Adisseo France SAS, Antony, France

ABSTRACT

Background: Selenium (Se) participates in different functions in humans and other animals through its incorporation into selenoproteins as selenocysteine. Inadequate dietary Se is considered a risk factor for several chronic diseases associated with oxidative stress.

Objective: The role of 2-hydroxy-(4-methylseleno)butanoic acid (HMSeBA), an organic form of Se used in animal nutrition, in supporting selenoprotein synthesis and protecting against oxidative stress was investigated in an in vitro model of intestinal Caco-2 cells.

Methods: Glutathione peroxidase (GPX) and thioredoxin reductase (TXNRD) activities, selenoprotein P1 protein (SELENOP) and gene (*SELENOP*) expression, and *GPX1* and *GPX2* gene expression were studied in Se-deprived (FBS removal) and further HMSeBA-supplemented (0.1–625 μ M, 72 h) cultures. The effect of HMSeBA supplementation (12.5 and 625 μ M, 24 h) on oxidative stress induced by H₂O₂ (1 mM) was evaluated by the production of reactive oxygen species (ROS), 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) adducts, and protein carbonyl residues compared with a sodium selenite control (SS, 5 μ M).

Results: Se deprivation induced a reduction ($P < 0.05$) in GPX activity (62%), *GPX1* expression, and both SELENOP (33%) and *SELENOP* expression. In contrast, an increase ($P < 0.05$) in *GPX2* expression and no effect in TXNRD activity ($P = 0.09$) were observed. HMSeBA supplementation increased ($P < 0.05$) GPX activity (12.5–625 μ M, 1.68–1.82-fold) and SELENOP protein expression (250 and 625 μ M, 1.87- and 2.04-fold). Moreover, HMSeBA supplementation increased ($P < 0.05$) *GPX1* (12.5 and 625 μ M), *GPX2* (625 μ M), and *SELENOP* (12.5 and 625 μ M) expression. HMSeBA (625 μ M) was capable of decreasing ($P < 0.05$) ROS (32%), 4-HNE adduct (49%), and protein carbonyl residue (75%) production after H₂O₂ treatment.

Conclusion: Caco-2 cells can use HMSeBA as an Se source for selenoprotein synthesis, resulting in protection against oxidative stress. *J Nutr* 2019;149:2191–2198.

Keywords: poultry, organic selenium, selenoproteins, oxidative stress, intestine, selenium deprivation, hydroxy-selenomethionine

Introduction

Selenium (Se) is an essential trace element that plays a role in many important biological functions in animals and humans (1, 2). Se mainly performs biological functions through its incorporation into selenoproteins in the form of selenocysteine (SeCys). Although in general selenoproteins are classified as antioxidants, they exhibit a wide range of functions [see (3) for a review]. The most abundant selenoproteins expressed in the intestine are glutathione peroxidases (GPXs), thioredoxin reductases (TXNRDs), and selenoprotein P1 (SELENOP) (4).

In humans, the GPX family contains 8 isoforms from which 4 members are selenoproteins expressed in the intestine (5, 6): the ubiquitous cytosolic GPX (GPX1), gastrointestinal GPX (GPX2), plasma GPX (GPX3), and phospholipid hydroperoxide GPX (GPX4). These enzymes catalyze the reduction of H₂O₂ and organic hydroperoxides using glutathione as a reducing cofactor.

TXNRDs are NAD(P)H-dependent flavoenzymes that regulate intracellular redox by reducing thioredoxin, a small active redox protein distributed ubiquitously in various mammalian tissues (7). In mammals, 3 TXNRD isoforms have been

reported: TXNRD1, found in the cytoplasm; TXNRD2, in mitochondria; and TXNRD3, expressed only in specialized tissues such as testis (3).

SELENOP is unique because it contains 10 SeCys residues in humans and 15 in dogs (8). The main function of SELENOP is to deliver Se to the whole body and it has been reported that the C-terminal domain, with ≤ 9 SeCys residues, is required for this transport function. In contrast, the N-terminal domain contains just 1 SeCys residue, with putative enzymatic antioxidant activity in the form of GPX4 and peroxynitrite reductase (9, 10). This selenoprotein is mainly produced in the liver and then secreted into the plasma, where SELENOP and GPX3 represent most of the Se. Nevertheless, it is also expressed, at the mRNA and protein levels, in the intestine, where it is secreted through the basolateral membrane (11). The function of SELENOP secreted in the intestine might be to protect epithelial membranes and to participate in the transport of the absorbed Se from the intestinal epithelium to the liver via the portal circulation or to support other cells with Se, in particular cells of the mucosa-associated lymphoid tissue in the gut (11).

In the intestine, inadequate dietary Se is considered a risk factor for several chronic diseases associated with oxidative stress and inflammation (12). The Se sources commonly used in dietary supplements are selenomethionine (SeMet) as well as sodium selenite (SS) and selenate. Most studies of the effects of Se are performed using Se in its inorganic form, usually SS. In contrast, here, we studied the role of 2-hydroxy-(4-methylseleno)butanoic acid (HMSeBA) as a source of Se in intestinal Caco-2 cells. Based on the homology between SeMet and methionine (Met), HMSeBA has been developed similarly to 2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid, a precursor of Met and widely used in animal nutrition as a source of Met (13). The nutritional efficacy of HMSeBA in broilers, layers, swine, and dairy cows has also been demonstrated (14–18). In fact, Fisinin et al. (19) consider that the enrichment of animal-derived foods (mainly meat, milk, and eggs) with Se via supplementation of animal feeds can be an effective way of increasing human Se status. To this end, we established a model of Se deprivation by removing FBS, because it naturally contains organic Se forms. Se-deprived cells were further supplemented with HMSeBA to study its capacity to support selenoprotein synthesis and to protect against oxidative stress, in comparison with SS.

Methods

Materials

DMEM, trypsin, TRI-reagent, penicillin, and streptomycin were supplied by Life Technologies. Nonessential amino acids, sterile

PBS, 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6-carboxyfluorescein) (BCECF), and SS were supplied by Sigma. FBS was purchased from GE Healthcare Life Sciences. HMSeBA (Selisseo) was provided by Adisseo France SAS. Tissue culture supplies, including Transwells, were obtained from Costar. L-[U- 14 C]-lactic acid (specific activity 165 mCi/mmol) was purchased from PerkinElmer. Filtron-X was supplied by National Diagnostics.

Caco-2 cell culture

Caco-2 cells were purchased from European Collection of Authenticated Cell Cultures. The cells were routinely grown in plastic flasks and cultured at a density of 10^3 cells/cm 2 as previously described (20). Cells were subcultured in Transwells for uptake experiments and intracellular pH (pH $_i$) measurements; in 24-well clusters to determine intracellular reactive oxygen species (ROS), protein carbonyl, and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) production; or in 75-cm 2 flasks to determine GPX and TXNRD activity, SELENOP protein expression, as well as *SELENOP*, *GPX1*, and *GPX2* gene expression.

Experiment 1: HMSeBA uptake

Transport experiments were performed as previously described (13). Only cell monolayers with transepithelial electrical resistance values $>1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ were used. Briefly, for cis-inhibition experiments, monolayers grown on filters were incubated at 37°C for 5 min in Krebs buffer containing 5 $\mu\text{Ci/mL}$ L-[U- 14 C]-lactic acid in the absence (control) or presence of 500 μM unlabeled HMSeBA in the apical compartment. Moreover, total Se in the basolateral medium after 2, 20, and 100 μM HMSeBA incubation was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; Agilent 7500ce) using Rh as the internal standard.

pH $_i$ was measured, as an indicator of H $^+$ -coupled HMSeBA transport, in Caco-2 cells grown on filters using the pH-sensitive fluorescent dye BCECF, as previously described (13). The preloaded monolayers with 7.5 μM BCECF were then incubated at an apical pH of 5.5, in the absence (control) or presence of 10 μM HMSeBA.

Experiment 2: Se deprivation

The model of Se deprivation was established taking into account that the only Se source in the culture medium is FBS. We analyzed the 2 batches of FBS used in this study by ICP-MS and the mean \pm SEM concentration of Se was found to be $153 \pm 3.6 \text{ nM}$ ($n = 6$). The final mean \pm SEM Se concentration in the culture medium was $13.9 \pm 0.3 \text{ nM}$ in the presence of FBS. Moreover, the main source of Met is DMEM, where the concentration of this amino acid is 0.2 mmol/L.

To establish the Se-deprivation model, Caco-2 cells were maintained in the presence or absence of FBS [referred to in these experiments as control and (-)FBS, respectively]. The control condition refers to cultures maintained with FBS for 2 wk. In contrast, (-)FBS refers to cultures maintained with FBS for 8 d (to allow the epithelium to reach confluence) and without FBS for 6 additional days (2 wk in total). In these conditions, GPX and TXNRD activity, SELENOP and *SELENOP* expression, as well as *GPX1* and *GPX2* gene expression were determined. Moreover, ROS production was determined as described previously (21).

For GPX and TXNRD activity and SELENOP protein expression, cells were collected by scrapping with 600 μL PBS and subjected to ultrasonic oscillation for 15 s with a 1.27-cm-tip probe, while maintaining the samples $<4^\circ\text{C}$. The supernatant obtained was collected and centrifuged at $9600 \times g$ for 5 min at 4°C (Accuspin Micro 17R, Fisher Scientific) and stored at -80°C until the day of the experiment.

GPX activity was determined with a commercial GPX assay kit (Cayman Chemical) following the manufacturer's instructions. The decrease in absorbance per minute from the supernatant was determined at an emission wavelength of 340 nm (Benchmark Plus Reader; BioRad). TXNRD activity was determined with a commercial TXNRD assay kit (Sigma). The increase in absorbance per minute from the supernatant was determined at an emission wavelength of 412 nm (TECAN). SELENOP protein expression was determined using a sandwich enzyme

Supported by the Fundació Bosch i Gimpera and Adisseo France SAS grant FBG 308920.

Author disclosures: JC-S, DM-A, MTB, MB, EP, RF, and RM-V, no conflicts of interest.

Address correspondence to RM-V (e-mail: raquelmartin@ub.edu).

Abbreviations used: BCECF, 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6-carboxyfluorescein); GPX, glutathione peroxidase; GPX4, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase; HMSeBA, 2-hydroxy-(4-methylseleno)butanoic acid; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; LDH, lactate dehydrogenase; MCT1, monocarboxylate transporter 1; NC, negative control; pH $_i$, intracellular pH; ROS, reactive oxygen species; Se, selenium; SeCys, selenocysteine; SeMet, selenomethionine; SELENOP, selenoprotein P1; SS, sodium selenite; TXNRD, thioredoxin reductase; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal.

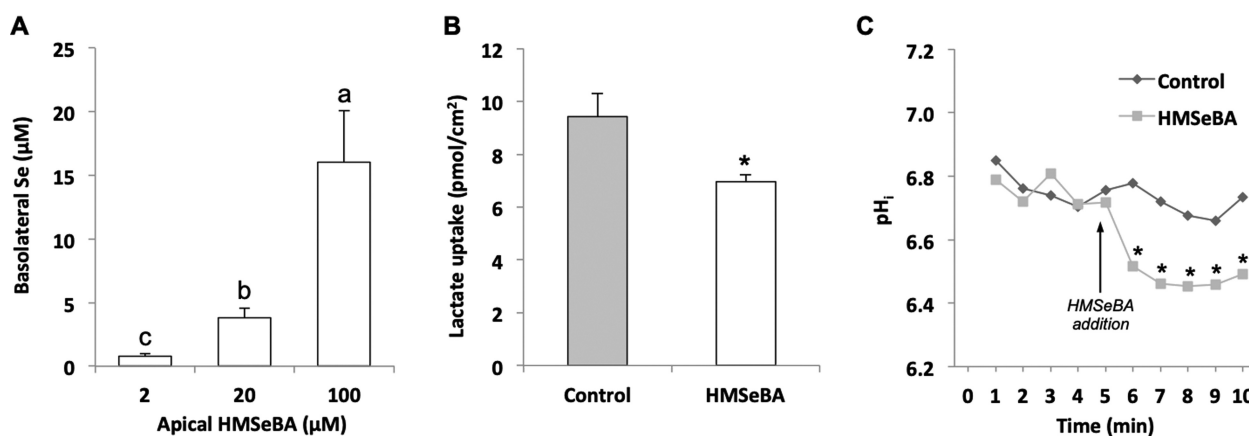


FIGURE 1 HMsEBA uptake (experiment 1). (A) Total basolateral Se after apical 2, 20, and 100 μM HMsEBA incubation; (B) L-lactate transport in the presence of 500 μM HMsEBA; and (C) pH_i in the presence of 10 μM HMsEBA in Caco-2 cells. The results were expressed as mean \pm SEM of $n = 3\text{--}4$ cultures. Different letters denote significant differences ($P < 0.05$). *Significant differences with respect to control ($P < 0.05$). HMsEBA, 2-hydroxy-(4-methylseleno)butanoic acid; pH_i, intracellular pH.

immunoassay technique performed with a commercial ELISA kit (Cusabio). Absorbance was measured at an emission wavelength of 450 nm (TECAN).

For *SELENOP* (SELENOP_selenoprotein P1, Life Technologies), *GPX1* (GPX1_glutathione peroxidase 1, Life Technologies), and *GPX2* (GPX2_glutathione peroxidase 2, Life Technologies) gene expression, cells were collected as aforementioned but using the pellet obtained after ultrasonic oscillation and processed as previously described (22). After testing different reference genes (ACTB_β-actine; GAPDH; and RPLP0_ribosomal protein lateral stalk subunit P0; Life Technologies), RPLP0 was used for normalization purposes. mRNA expression was calculated as fold changes using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method. RT-PCR analysis was performed at the Centres Científics i Tecnològics of the University of Barcelona.

Experiment 3: HMsEBA supplementation

For the Se-supplementation experiments, Se-deprived cells [referred to in these experiments as negative control (NC)] were supplemented after 14 d in culture with HMsEBA or SS during an additional period of 72 h. First, to evaluate the possible cytotoxic effect of these sources, lactate dehydrogenase (LDH) release to the medium after the incubation with HMsEBA (12.5 μM , 12.5 μM , 625 μM , and 1.25 mM) or SS (5 μM , 12.5 μM , and 50 μM) was analyzed as previously described (21). Then, GPX activity and SELENOP protein expression were evaluated in cultures supplemented with 0.1–625 μM HMsEBA, using SS (5 μM) for comparative purposes. Moreover, TXNRD activity was tested in cultures supplemented with 12.5 μM HMsEBA. Finally, *SELENOP*, *GPX1*, and *GPX2* gene expression was evaluated in cultures supplemented with 12.5 and 625 μM HMsEBA or 5 μM SS.

Experiment 4: HMsEBA and oxidative stress

Oxidative stress after H_2O_2 treatment was evaluated by determination of ROS, protein carbonyl, and 4-HNE production. Se-deprived cells (NC) were preincubated with 12.5 and 625 μM HMsEBA or SS (5 μM) for 24 h and then stimulated with H_2O_2 (1 mM). After 3 h, ROS production was determined as aforementioned. 4-HNE and protein carbonyl production were determined using a commercial lipid peroxidation kit (Cell Biolabs Inc.) and with a commercial protein-damage kit (Cell Biolabs Inc.), respectively. The absorbance of the supernatant was determined at an emission wavelength of 450 nm (TECAN) for both determinations.

Statistical analysis

Results are given as means \pm SEMs. Significant differences were detected by 1-factor ANOVA (for results in Figures 1B and 2) followed by Bonferroni's post hoc test (for results in Figure 1A and Figures 3–6)

or Student's *t* test (for results in Figure 1C for each incubation time after HMsEBA addition with respect to control) using the SPSS software (SPSS Inc.). $P < 0.05$ was considered to denote significance.

Results

In experiment 1, Caco-2 cell incubation with increasing HMsEBA concentrations produced a dose-dependent increase of Se concentration in the basolateral compartment ($P < 0.05$ between HMsEBA concentrations) (Figure 1A). HMsEBA (used in cis-experiments as a competitive inhibitor) inhibited lactate uptake ($P < 0.05$) by 26 % (Figure 1B) and produced a decrease in pH_i ($P < 0.05$ for each incubation time) (Figure 1C).

In experiment 2 (Figure 2), Se deprivation (cultures maintained with FBS for 8 d and without FBS for 6 additional days) induced a reduction ($P < 0.05$) in GPX activity (62%), *GPX1* gene expression, and both SELENOP (33%) and *SELENOP* expression. In contrast, an increase ($P < 0.05$) in *GPX2* gene expression and ROS production (2.87-fold) was observed. TXNRD activity revealed no changes ($P = 0.09$) with FBS removal (control: $3.98 \pm 0.49 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$; (-)FBS: $6.00 \pm 1.11 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$, mean \pm SEM of $n = 4$ cultures).

In experiment 3, HMsEBA did not compromise cell viability relative to control ($P \geq 0.05$), whereas SS produced an increase ($P < 0.05$) in LDH release starting at 12.5 μM (1.49- and 1.46-fold) (Figure 3). Therefore, for comparative purposes, SS was used in further experiments at the highest nontoxic concentration available (5 μM). As shown in Figure 4A, GPX activity increased ($P < 0.05$) with HMsEBA supplementation at $\geq 12.5 \mu\text{M}$ relative to NC (1.68–1.82-fold), reaching similar values to those obtained with SS ($P \geq 0.05$) except for 0.1 μM HMsEBA ($P < 0.05$). The values obtained with HMsEBA and SS supplementation did not reach FBS-containing results ($P < 0.05$, Figure 2A compared with Figure 4A). Further gene expression experiments were performed with 2 HMsEBA concentrations: the lowest that increased GPX activity (12.5 μM) and the highest one tested (625 μM). HMsEBA supplementation increased ($P < 0.05$) *GPX1* (12.5 and 625 μM) and *GPX2* (625 μM) gene expression relative to NC (Figure 4B, C). In both cases, no differences were detected between SS and NC ($P = 1.00$ for *GPX1* and $P = 0.76$ for

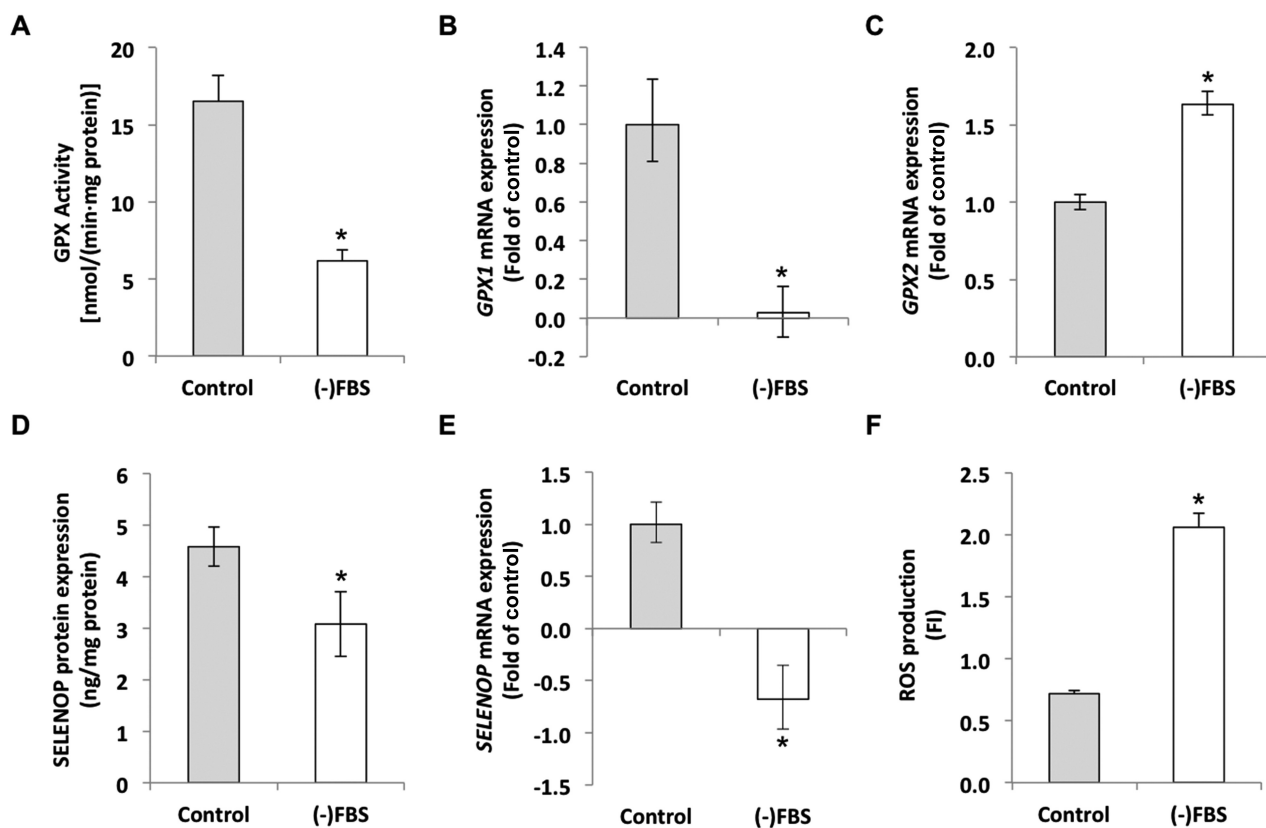


FIGURE 2 Se deprivation (experiment 2). (A) GPX activity ($n = 6$), (B) *GPX1* relative gene expression ($n = 8$), (C) *GPX2* relative gene expression ($n = 8$), (D) SELENOP protein expression ($n = 8$), (E) *SELENOP* relative gene expression ($n = 8$), and (F) ROS production ($n = 9$) were determined in Caco-2 cells cultured in the presence and absence of FBS [control and (-)FBS, respectively]. In the case of gene expression, the results were expressed relative to control values. The results were expressed as mean \pm SEM of n cultures. *Significant differences with respect to control ($P < 0.05$). FI, fluorescence intensity; GPX, glutathione peroxidase; ROS, reactive oxygen species; SELENOP, selenoprotein P1.

GPX2). In the case of SELENOP protein expression (Figure 5A), an increase ($P < 0.05$) was also observed at high concentrations of HMSeBA (250 and 625 μM) relative to NC (1.87- and 2.04-fold, respectively), reaching similar values to those obtained with SS ($P \geq 0.05$) and with FBS ($P \geq 0.05$, Figure 2D

compared with Figure 5A). For *SELENOP* gene expression (Figure 5B), an increase relative to NC ($P < 0.05$) for both HMSeBA concentrations tested was observed. Here again, no differences ($P = 0.11$) were detected between SS and NC. In the case of TXNRD activity, an increase by 1.94-fold with 12.5

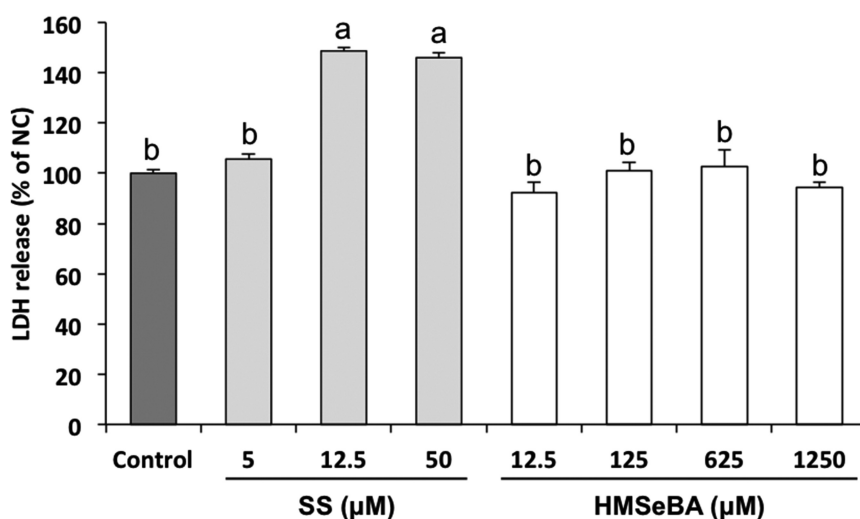


FIGURE 3 HMSeBA supplementation: LDH release (experiment 3). LDH release was determined in Caco-2 cells cultured in the presence of FBS (control, $n = 12$); or supplemented with 5–50 μM SS ($n = 6$) or 12.5 μM –1.25 mM HMSeBA ($n = 6$). The results were expressed as mean \pm SEM of n cultures. Different letters denote significant differences ($P < 0.05$). HMSeBA, 2-hydroxy-(4-methylseleno)butanoic acid; LDH, lactate dehydrogenase; NC, negative control; SS, sodium selenite.

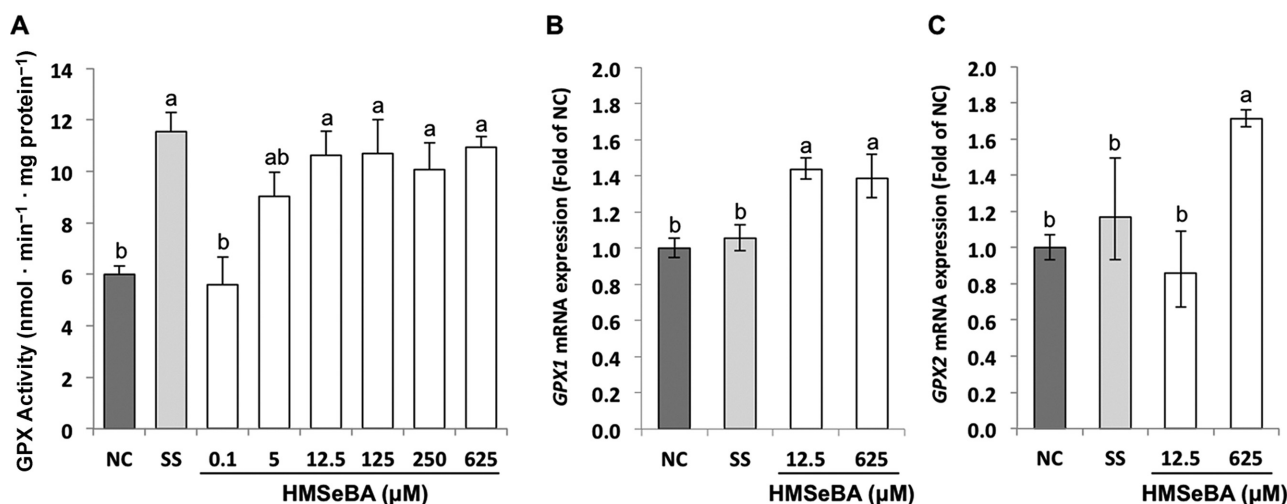


FIGURE 4 HMSeBA supplementation: GPX activity, and *GPX1* and *GPX2* relative gene expression (experiment 3). (A) GPX activity ($n = 4$), (B) *GPX1* relative gene expression ($n = 6$), and (C) *GPX2* relative gene expression ($n = 6$) were determined in Caco-2 cells maintained in the absence of FBS (NC); and supplemented with 5 μM SS or 0.1–625 μM HMSeBA. Different letters denote significant differences ($P < 0.05$). In the case of gene expression, the results were expressed relative to NC values. The results were expressed as mean \pm SEM of n cultures. GPX, glutathione peroxidase; HMSeBA, 2-hydroxy-(4-methylseleno)butanoic acid; NC, negative control; SS, sodium selenite.

μM HMSeBA was observed (NC: 6.42 ± 0.96 nmol \cdot min⁻¹ \cdot mg protein⁻¹; 12.5 μM HMSeBA: 12.3 ± 2.37 nmol \cdot min⁻¹ \cdot mg protein⁻¹, mean \pm SEM of $n = 4$ and 5 cultures, respectively, $P < 0.05$).

In experiment 4 (Figure 6), the stimulation of NC cells with H₂O₂ increased ($P < 0.05$) ROS (2.24-fold), 4-HNE adduct (2.22-fold), and protein carbonyl (5.19-fold) production. In these conditions, only the supplementation with HMSeBA at a concentration of 625 μM was capable of counteracting the effect of H₂O₂, reaching values of nonstimulated cells ($P \geq 0.05$) in the case of 4-HNE adduct and protein carbonyl production.

Discussion

Se deficiency is associated with several diseases in animals and humans (1, 23). Relatively low Se intakes determine the expression of selenoproteins, of which it is an essential constituent. In addition, higher intakes have been shown to have anti-inflammatory and antitumorigenic potential; but very high Se intakes can produce adverse effects (4). Because it is well reported that Se supplementation is required for optimal growth (15), its incorporation in animal diets is of great importance.

To study the capacity of Caco-2 cells to use HMSeBA as a Se source, the uptake of this molecule as well as its

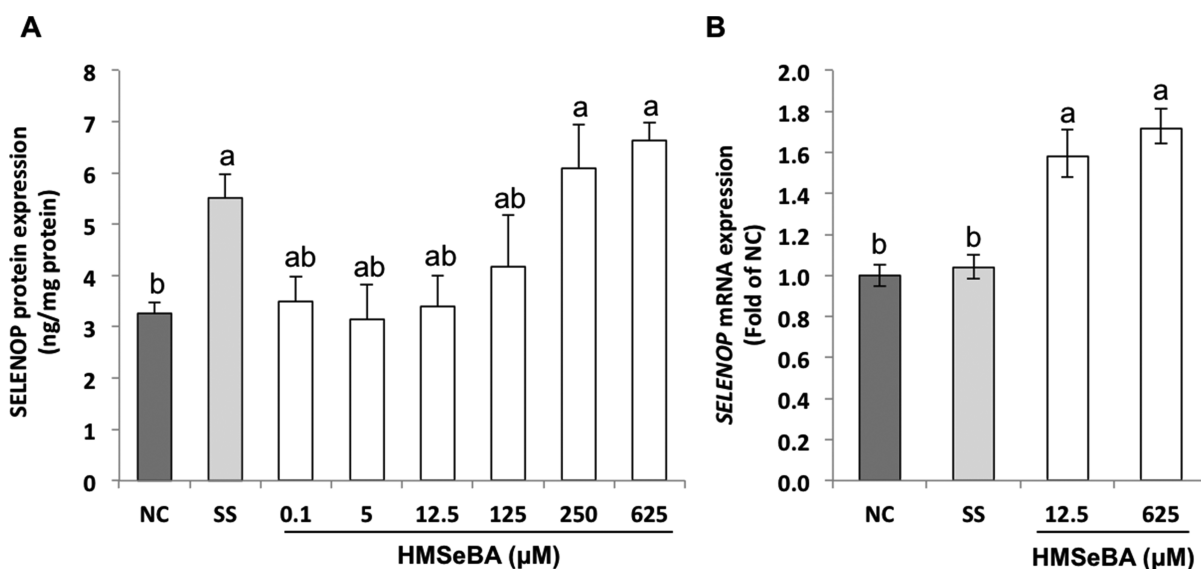


FIGURE 5 HMSeBA supplementation: SELENOP protein and *SELENOP* relative gene expression (experiment 3). (A) SELENOP protein expression and (B) *SELENOP* relative gene expression were determined in Caco-2 cells maintained in the absence of FBS (NC) and supplemented with 5 μM SS or 0.1–625 μM HMSeBA. Different letters denote significant differences ($P < 0.05$). In the case of gene expression, the results were expressed relative to NC values. The results were expressed as mean \pm SEM of $n = 5$ cultures. HMSeBA, 2-hydroxy-(4-methylseleno)butanoic acid; NC, negative control; SELENOP, selenoprotein P1; SS, sodium selenite.

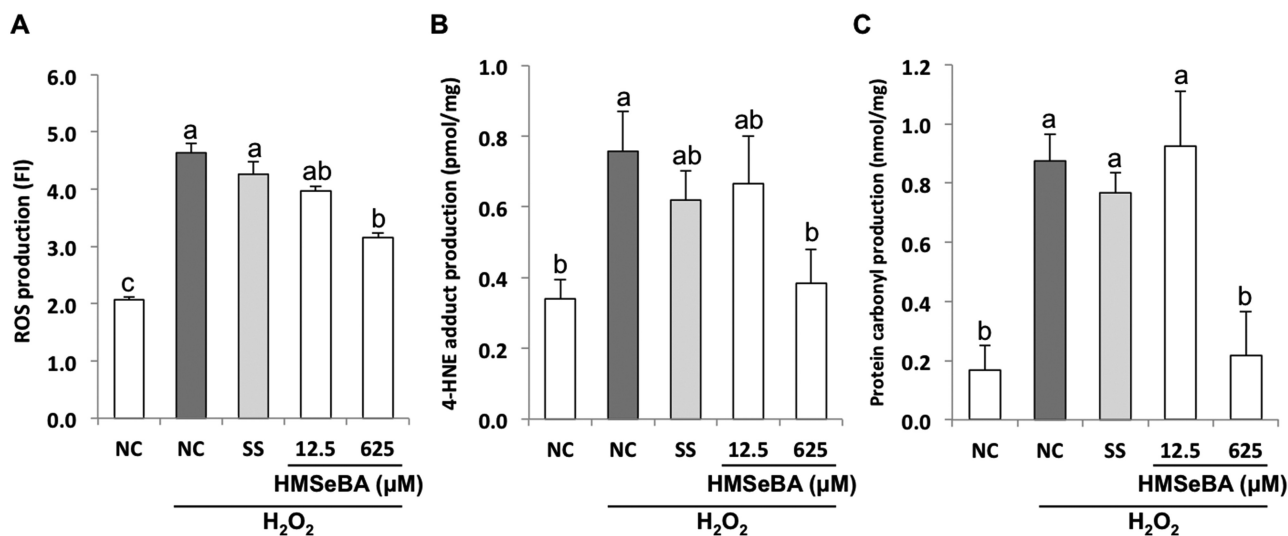


FIGURE 6 HMSeBA and oxidative stress (experiment 4). (A) ROS ($n = 9$), (B) 4-HNE ($n = 5$), and (C) protein carbonyl ($n = 5$) production were determined in Caco-2 cells maintained in the absence of FBS (NC) and treated with H₂O₂ (1 mM) in the absence of any Se source, or in cultures supplemented with 5 μM SS, or 12.5 and 625 μM HMSeBA. Different letters denote significant differences ($P < 0.05$). The results were expressed as mean \pm SEM of n cultures. FI, fluorescence intensity; HMSeBA, 2-hydroxy-(4-methylseleno)butanoic acid; NC, negative control; ROS, reactive oxygen species; SS, sodium selenite; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal.

potential toxicity needed to be investigated. Taking into account the results of Nickel et al. (24) indicating that SeMet shares 2 transport systems with Met, our hypothesis was that HMSeBA could share monocarboxylate transporter 1 (MCT1) with the hydroxy analog of Met (13). Because MCT1 is a H⁺-dependent transporter with lactate as a specific substrate, the results obtained in cis-inhibition experiments as well as the reduction in pH_i confirm this hypothesis. Moreover, HMSeBA did not show cytotoxicity at any of the concentrations tested. In contrast, according to Barrera et al. (25) and Takahashi et al. (26), SS showed a remarkable cytotoxicity; in our case, already at 12.5 μM. For this reason, SS was used at 5 μM in further experiments, whereas the range of HMSeBA tested was higher owing to its low toxicity in our cell cultures. Higher HMSeBA concentrations are also justified by the fact that this source has to be previously converted to SeMet (15) and that the formed SeMet could be incorporated into proteins in the place of Met nonspecifically, thus representing an endogenous Se reserve which can be later used for selenoprotein synthesis (1).

Our results indicate that Se deprivation reduced GPX activity. Because Se is the limiting factor for GPX protein synthesis (25), the reduction in GPX activity is a common feature in Se-deprived models of Caco-2 cells in which deprivation is induced by the removal of FBS from the culture medium (27–29). Similarly, GPX activity was also reduced in the colon of mice fed a Se-deficient compared with a Se-adequate diet (30). Our results also report that HMSeBA supplementation was capable of inducing GPX activity in Caco-2 cells. In this sense, Wang and Fu (31) reported similar values of GPX activity for both SS and SeMet. Regulation of the synthesis of different GPX isoforms is a complex process (32). Indeed, whereas GPX1 responds to decreased Se via a loss of protein and activity together with a marked reduction of mRNA amounts, GPX2 mRNA is only slightly reduced or even increased by a low Se supply (25, 33, 34), according with our results in the Se-deprived model. Interestingly, it has been reported that GPX2 and also TXNRD1 gene expression are upregulated on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 activation resulting from

oxidative stress generated by Se deficiency (29). In fact, our results revealed an increase in ROS production in the absence of Se. In this way, the fact that TXNRD activity was not modified by Se removal could be related to the gene regulation that it shares in common with GPX2. Nevertheless, a reduction in the mRNA degradation rate of GPX2 and TXNRD1 in the absence of Se could not be discarded (35, 36). Therefore, we can assume that the mRNA of GPX2 is increased under conditions of limited Se supply to become preferentially translated when Se supply is restored (37). The supplementation with HMSeBA was capable of increasing GPX1 and GPX2 gene expression. Accordingly, it has also been described that organic forms such as SeMet, SeCys, as well as HMSeBA have a greater capacity to induce mRNA expression of different GPX isoforms than SS (38–40). Moreover, HMSeBA was also capable of promoting TXNRD activity. In accordance with this, De Spirt et al. (29) demonstrated an increase in TXNRD activity in Se-supplementation conditions. Nevertheless, it has been reported that neither TXNRD1 nor TXNRD2 gene expression (38, 41, 42), nor their protein expression (29, 42), are affected by Se supplementation.

In Se-deficient conditions, the liver sharply reduces GPX1 expression to maintain the synthesis of other selenoproteins, such as SELENOP, so that this organ can mobilize Se to other tissues (43) such as the intestinal epithelium. In Caco-2 cells we have observed a reduction of SELENOP protein expression under conditions in which Se is not available. In addition, Speckmann et al. (11) found a decrease of basolateral SELENOP secretion in Se-deprived Caco-2 cell cultures. Our results revealed that to induce SELENOP protein expression, a higher concentration of HMSeBA in comparison with SS was needed. Along the same lines, in HepG2 cells, both SS and SeMet can induce SELENOP protein expression, although the results obtained with the inorganic form are 4-fold greater than those obtained with the organic form (44). Nevertheless, only HMSeBA was capable of preparing the cell by also increasing SELENOP gene expression. In fact, a higher capacity to induce SELENOP gene expression for HMSeBA than for SS was

detected in chicken liver and muscle (40). In this sense, Yuan et al. (45) reported that the mRNA amount of *SELENOP* significantly increases upon use of organic Se, whereas no effect was found with SS. Regarding the apparent discrepancies found between *SELENOP* and *SELENOP* expression, Bermano et al. (46) stated that Se supply regulates in a differential manner both the activity of the selenoenzymes and the abundance of their respective mRNAs. In fact, selenoprotein expression is regulated both at a translational level and at the level of RNA stability (30) owing to the regulation by mRNA sequences and/or RNA-binding proteins (47).

The increase in *GPX1*, *GPX2*, and *SELENOP* gene expression may be of importance in terms of protection against oxidative stress because only HMSeBA was capable of protecting against H₂O₂ treatment. In fact, previous studies have demonstrated that organic Se shows better protective effects than inorganic forms under different stress conditions (25, 39, 48, 49). Although synergistic anti-inflammatory activity of *GPX1* and *GPX2* has been postulated, it has been demonstrated that the role of *GPX2* is more important, because a single allele of *GPX2* (but not of *GPX1*) proved to be sufficient to prevent inflammation in mice (50). We have to consider that this selenoprotein is highly expressed in intestine and its upregulation appears to be part of the adaptive response, and thus a compensatory mechanism involved in the protection of intestinal epithelial homeostasis (51, 52). Moreover, Xiao et al. (53) reported that HaCaT cells overexpressing *SELENOP* are resistant to oxidative stress and toxicity, thus also highlighting the antioxidant functions of this selenoprotein, as other authors found in fibroblasts (54, 55).

In summary, our results indicate that HMSeBA, an organic form of Se which was less toxic than SS, was capable of supporting *GPX* and *TXNRD* enzyme activity as well as *SELENOP* protein synthesis. Moreover, this source affected the transcription levels of *GPX1*, *GPX2*, and *SELENOP*. Furthermore, in contrast to SS, HMSeBA was capable of efficiently counteracting the effects of H₂O₂. The increase in gene expression of some selenoproteins after Se incubation allows the cell to rapidly synthesize selenoproteins, resulting in enhanced protection against oxidative stress. In conclusion, the organic form HMSeBA is used as a Se source by Caco-2 cells and contributes to maintaining intestinal epithelial homeostasis by protecting against oxidative stress.

Acknowledgments

The authors' responsibilities were as follows—MB, EP, RF, and RM-V: designed the research; JC-S, DM-A, and MTB: conducted the research; JC-S and RM-V: analyzed the data; JC-S, RF, and RM-V: wrote the paper and had primary responsibility for the final content; and all authors: read and approved the final manuscript.

References

- Schrauzer GN. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. *Adv Food Nutr Res* 2003;47:73–112.
- Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet* 2012;379:1256–68.
- Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2012;16:705–43.
- Combs GF. Biomarkers of selenium status. *Nutrients* 2015;7:2209–36.
- Chu FF, Esworthy RS, Doroshov JH. Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1481–95.

- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:775–806.
- Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* 2000;2:811–20.
- Labunskyy VM, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiol Rev* 2014;94:739–77.
- Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem* 1998;379:1201–5.
- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J Biol Chem* 1999;274:2866–71.
- Speckmann B, Bidmon HJ, Borchardt A, Sies H, Steinbrenner H. Intestinal selenoprotein P in epithelial cells and in plasma cells. *Arch Biochem Biophys* 2014;541:30–6.
- Speckmann B, Steinbrenner H. Selenium and selenoproteins in inflammatory bowel diseases and experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:1110–9.
- Martín-Venegas R, Rodríguez-Lagunas MJ, Geraert PA, Ferrer R. Monocarboxylate transporter 1 mediates DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid transport across the apical membrane of Caco-2 cell monolayers. *J Nutr* 2007;137:49–54.
- Briens M, Mercier Y, Rouffineau F, Vacchina V, Geraert PA. Comparative study of a new organic selenium source v. seleno-yeast and mineral selenium sources on muscle selenium enrichment and selenium digestibility in broiler chickens. *Br J Nutr* 2013;110:617–24.
- Briens M, Mercier Y, Rouffineau F, Mercierand F, Geraert PA. 2-Hydroxy-4-methylselenobutanoic acid induces additional tissue selenium enrichment in broiler chickens compared with other selenium sources. *Poult Sci* 2014;93:85–93.
- Jlali M, Briens M, Rouffineau F, Mercierand F, Geraert PA, Mercier Y. Effect of 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid as a dietary selenium supplement to improve the selenium concentration of table eggs. *J Anim Sci* 2013;91:1745–52.
- Jlali M, Briens M, Rouffineau F, Geraert PA, Mercier Y. Evaluation of the efficacy of 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid on growth performance and tissue selenium retention in growing pigs. *J Anim Sci* 2014;92:182–8.
- Sun P, Wang J, Liu W, Bu DP, Liu SJ, Zhang KZ. Hydroxy-selenomethionine: a novel organic selenium source that improves antioxidant status and selenium concentrations in milk and plasma of mid-lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 2017;100:9602–10.
- Fisinin VI, Papazyan TT, Surai PF. Producing selenium-enriched eggs and meat to improve the selenium status of the general population. *Crit Rev Biotechnol* 2009;29:18–28.
- Martín-Venegas R, Brufau MT, Guerrero-Zamora AM, Mercier Y, Geraert PA, Ferrer R. The methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid protects intestinal epithelial barrier function. *Food Chem* 2013;141:1702–9.
- Brufau MT, Campo-Sabariz J, Bou R, Carné S, Brufau J, Vilà B, Marqués AM, Guardiola F, Ferrer R, Martín-Venegas R. Salmosan, a β -galactomannan-rich product, protects epithelial barrier function in Caco-2 cells infected by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J Nutr* 2016;146:1492–8.
- Martín-Venegas R, Brufau MT, Mañas-Cano O, Mercier Y, Nonis MK, Ferrer R. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in Caco-2 cells by the methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio)butanoic acid. *Vet J* 2014;202:555–60.
- Roman M, Jitaru P, Barbante C. Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 2014;6:25–54.
- Nickel A, Kottra G, Schmidt G, Danier J, Hofmann T, Daniel H. Characteristics of transport of selenoamino acids by epithelial amino acid transporters. *Chem Biol Interact* 2009;177:234–41.
- Barrera LN, Cassidy A, Wang W, Wei T, Belshaw NJ, Johnson IT, Brigelius-Flohé R, Bao Y. TrxR1 and GPx2 are potentially induced by isothiocyanates and selenium, and mutually cooperate to protect Caco-2 cells against free radical-mediated cell death. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823:1914–24.
- Takahashi K, Suzuki N, Ogra Y. Bioavailability comparison of nine bioselenocompounds in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci* 2017;18(3):506.

27. Wingler K, Müller C, Schmehl K, Florian S, Brigelius-Flohé R. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology* 2000;119:420–30.
28. Zeng H, Botnen JH, Johnson LK. A selenium-deficient Caco-2 cell model for assessing differential incorporation of chemical or food selenium into glutathione peroxidase. *Biol Trace Elem Res* 2008;123:98–108.
29. De Spirt S, Eckers A, Wehrend C, Micoogullari M, Sies H, Stahl W, Steinbrenner H. Interplay between the chalcone cardamomin and selenium in the biosynthesis of Nrf2-regulated antioxidant enzymes in intestinal Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med* 2016;91:164–71.
30. Kipp A, Banning A, van Schothorst EM, Méplan C, Schomburg L, Evelo C, Coort S, Gaj S, Keijer J, Hesketh J, et al. Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:1561–72.
31. Wang Y, Fu L. Forms of selenium affect its transport, uptake and glutathione peroxidase activity in the Caco-2 cell model. *Biol Trace Elem Res* 2012;149:110–6.
32. Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohé R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Mol Cell Biol* 2005;25:4914–23.
33. Speckmann B, Bidmon HJ, Pinto A, Anlauf M, Sies H, Steinbrenner H. Induction of glutathione peroxidase 4 expression during enterocytic cell differentiation. *J Biol Chem* 2011;286:10764–72.
34. Maciel-Dominguez A, Swan D, Ford D, Hesketh J. Selenium alters miRNA profile in an intestinal cell line: evidence that miR-185 regulates expression of GPX2 and SEPSH2. *Mol Nutr Food Res* 2013;57:2195–205.
35. Wingler K, Müller C, Brigelius-Flohé R. Stability of gastrointestinal glutathione peroxidase mRNA in selenium deficiency depends on its 3'UTR. *Biofactors* 2001;14:43–50.
36. Seyedali A, Berry MJ. Nonsense-mediated decay factors are involved in the regulation of selenoprotein mRNA levels during selenium deficiency. *RNA* 2014;20:1248–56.
37. Wingler K, Brigelius-Flohé R. Gastrointestinal glutathione peroxidase. *Biofactors* 1999;10:245–9.
38. Maseko T, Howell K, Dunshea FR, Ng K. Selenium-enriched *Agaricus bisporus* increases expression and activity of glutathione peroxidase-1 and expression of glutathione peroxidase-2 in rat colon. *Food Chem* 2014;146:327–33.
39. Song E, Su C, Fu J, Xia X, Yang S, Xiao C, Lu B, Chen H, Sun Z, Wu S, et al. Selenium supplementation shows protective effects against patulin-induced brain damage in mice via increases in GSH-related enzyme activity and expression. *Life Sci* 2014;109:37–43.
40. Zhao L, Sun LH, Huang JQ, Briens M, Qi DS, Xu SW, Lei XG. A novel organic selenium compound exerts unique regulation of selenium speciation, selenogenome, and selenoproteins in broiler chicks. *J Nutr* 2017;147:789–97.
41. Hu Y, McIntosh GH, Le Leu RK, Young GP. Selenium-enriched milk proteins and selenium yeast affect selenoprotein activity and expression differently in mouse colon. *Br J Nutr* 2010;104:17–23.
42. Kipp AP, Müller MF, Göken EM, Deubel S, Brigelius-Flohé R. The selenoproteins GPx2, TrxR2 and TrxR3 are regulated by Wnt signalling in the intestinal epithelium. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:1588–96.
43. Burk RF, Hill KE. Regulation of selenium metabolism and transport. *Annu Rev Nutr* 2015;35:109–34.
44. Hoefig CS, Renko K, Köhrle J, Birringer M, Schomburg L. Comparison of different selenocompounds with respect to nutritional value vs. toxicity using liver cells in culture. *J Nutr Biochem* 2011;22:945–55.
45. Yuan D, Zheng L, Guo XY, Wang YX, Zhan XA. Regulation of selenoprotein P concentration and expression by different sources of selenium in broiler breeders and their offspring. *Poult Sci* 2013;92:2375–80.
46. Bermanno G, Nicol F, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE. Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *Biochem J* 1995;311:425–30.
47. Müller C, Wingler K, Brigelius-Flohé R. 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol Chem* 2003;384:11–8.
48. Bansal MP, Kaur T. Growth characteristics and selenium status changes of yeast cells with inorganic and organic selenium supplementation: selenium, a chemopreventive agent. *J Med Food* 2002;5:85–90.
49. Sahin N, Onderci M, Sahin K, Kucuk O. Supplementation with organic or inorganic selenium in heat-distressed quail. *Biol Trace Elem Res* 2008;122:229–37.
50. Esworthy RS, Yang L, Frankel PH, Chu FF. Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice. *J Nutr* 2005;135:740–5.
51. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Selenium and redox signaling. *Arch Biochem Biophys* 2017;617:48–59.
52. Banning A, Florian S, Deubel S, Thalmann S, Müller-Schmehl K, Jacobasch G, Brigelius-Flohé R. GPx2 counteracts PGE₂ production by dampening COX-2 and mPGES-1 expression in human colon cancer cells. *Antioxid Redox Signal* 2008;10:1491–500.
53. Xiao W, Zhu Y, Sarsour EH, Kalen AL, Aykin-Burns N, Spitz DR, Goswami PC. Selenoprotein P regulates 1-(4-chlorophenyl)-benzo-2,5-quinone-induced oxidative stress and toxicity in human keratinocytes. *Free Radic Biol Med* 2013;65:70–7.
54. Kabuyama Y, Oshima K, Kitamura T, Homma M, Yamaki J, Munakata M, Homma Y. Involvement of selenoprotein P in the regulation of redox balance and myofibroblast viability in idiopathic pulmonary fibrosis. *Genes Cells* 2007;12:1235–44.
55. Eckers JC, Kalen AL, Xiao W, Sarsour EH, Goswami PC. Selenoprotein P inhibits radiation-induced late reactive oxygen species accumulation and normal cell injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013;87:619–25.

